

CARACTERIZACIÓN DE RECURSOS FORRAJEROS HERBÁCEOS,
ARBÓREOS Y ARBUSTIVOS DE USO CONVENCIONAL Y ALTERNATIVO EN
EL TRÓPICO ALTO DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO, MEDIANTE EL USO
DE LA TÉCNICA *In vitro* DE PRODUCCIÓN DE GASES

JUAN PABLO NARVÁEZ HERRERA
JULIE MARCELA DELGADO RODRÍGUEZ

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE ZOOTECNIA
SAN JUAN DE PASTO
2011

CARACTERIZACIÓN DE RECURSOS FORRAJEROS HERBÁCEOS,
ARBÓREOS Y ARBUSTIVOS DE USO CONVENCIONAL Y ALTERNATIVO EN
EL TRÓPICO ALTO DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO, MEDIANTE EL USO
DE LA TÉCNICA *In vitro* DE PRODUCCIÓN DE GASES

JUAN PABLO NARVÁEZ HERRERA
JULIE MARCELA DELGADO RODRÍGUEZ

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Zootecnistas

Presidente
JOSÉ EDMUNDO APRÁEZ GUERRERO
Zootecnista. Esp. MSc. PhD.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE ZOOTECNIA
SAN JUAN DE PASTO
2011

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado, son responsabilidad exclusiva de los autores”

Artículo 1ro del acuerdo N° 324 de octubre de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño

NOTA DE ACEPTACIÓN

JOSÉ EDMUNDO APRÁEZ GUERRERO
Presidente

HERNÁN OJEDA JURADO
Jurado delegado

EFRÉN G. INSUASTY SANTACRUZ
Jurado

San Juan de Pasto, Septiembre 6 de 2011.

DEDICATORIA

A Dios por la vida y a la Virgencita de las Lajas.

A mis padres Fredy y Rosa, por ser mi ejemplo a seguir y por su incansable apoyo y dedicación en formarme y guiarme siempre, a Freider por su confianza, y apoyo, por ser más que mi hermano, mi amigo.

A mis sobrinos Miguel Alejandro, Julián Andrés y la princesita Fabiana.

A Julie por acompañarme, guiarme, enseñarme y comprenderme.

A todos los miembros de mi familia gracias, por ser un soporte fundamental en mi vida y de una forma muy especial a mi Abuela «Nana».

A mis amigos y compañeros de la Universidad, mis «compadres» en los buenos y malos momentos.

Quiero expresar una dedicatoria muy especial para mi hermanita Liliana Marcela y mi tía Lidia Narváez, que partieron de este mundo a recorrer el infinito... siempre estarán en mi recuerdo y en lo más profundo de mí ser.

Así mismo, quiero manifestar mi gratitud a todas las personas que conocí en esta bella etapa de mi vida, y quienes participaron de una u otra manera en el desarrollo y enriquecimiento de este trabajo, ¡muchas gracias para todos! y especialmente, muchas gracias a la **UNIVERSIDAD DE NARIÑO**.

Juan Pablo

A Dios, por planear mi vida, por darme las ganas y la fe necesaria para enfrentar los retos de cada nuevo día, por iluminar mi camino guiándome hacia la realización de mis sueños y por proveerme fortaleza en aquellos tantos momentos cuando creí que no sería capaz.

A mis padres, Juan Bernardo y María Teresa, mi hermana y mi abuelito José, por confiar en mí más allá de las dificultades y por el amor infinito del que me han rodeado siempre...

A Juan Pablo, por ser mi inspiración y mi fuerza para realizar tantos sueños, por compartírmelos conmigo y ayudarme a construir otros más...

A Marcela (q e p d) por la inspiración que su valentía fue para mi vida...

A doña Rosa, don Freddy y Fabianita, por su confianza y su apoyo incondicional, por ofrecerme su cariño, ese que reconforta tanto cuando más se necesita...

A mi tía Bertha, don Roberto, Roberth, Zulma, Nayith, María José, Samuel, Nathaly, don Andrés y don Fernando, por regalarme un poco de su cariño y comprensión y acogerme en su hogar... gracias por ser mi segunda familia...

A mis amigos, con quienes los lazos de amistad se tejieron desde que empezamos la carrera, y pese a las distancias que hoy quieran separarnos seguirán perdurables a través de los años... a Cristina, Ana María, Viviana, Camilo, Edwin y Jhon Jairo, por ser mis amigos, compañeros, y cómplices de múltiples aventuras, por compartir mis alegrías y todo cuanto ha sido posible compartir.... Por tolerar mi mal genio, por aceptarme como soy... Por estar allí con la palabra de aliento y la mano amiga y segura cada vez que ha sido necesario, por sus oraciones y buenos deseos, por todo el tiempo compartido, por la mejor época de nuestras vidas
Gracias...

Julie Marcela

AGRADECIMIENTOS

JOSÉ EDMUNDO APRÁEZ GUERRERO. Zootecnista. Esp. MSc. PhD. Universidad de Nariño.

HERNAN OJEDA JURADO. Zootecnista. Esp. Universidad de Nariño.

EFRÉN GUILLERMO INSUASTY SANTACRUZ. Zootecnista. MSc. Universidad de Nariño.

JAVIER ANDRÉS MARTINEZ BENAVIDES. Zootecnista. MSc. Director Departamento de Producción y Procesamiento Animal, Programa de Zootécnia. Universidad de Nariño.

MARTHA SOFÍA GONZALES INSUASTY. Bióloga. PhD. Directora Departamento de Biología. Universidad de Nariño.

GLORIA SANDRA ESPINOSA NARVAEZ. Tecnóloga Química, Ingeniera en Producción Acuícola, Laboratorista. Unidad de Laboratorios Especializados. Universidad de Nariño.

PILAR NARVÁEZ. Zootecnista. Laboratorista, Unidad de Laboratorios Especializados. Universidad de Nariño.

DAVID ARTURO, JUAN PABLO JIMENEZ. Técnicos Laboratorio de Cromatografía. Universidad de Nariño.

LUIS CARLOS RUALES DEL CASTILLO. Zootecnista. Esp. Administrador Granja Lechera Chimangual. Universidad de Nariño.

OSCAR FERNANDO BENAVIDES ESPÍNDOLA. Zootecnista. Esp. MSc. Director de Granjas. Universidad de Nariño.

CARLOS SOLARTE PORTILLA. Zootecnista. MSc. PhD. Director grupo de investigación MEGALAC. Universidad de Nariño.

LUIS ERNESTO VITERY SARASTY. Zootecnista. Esp. Universidad de Nariño.

CAMILO GUERRERO. I.P.A. Técnico de Laboratorio Programa Ingeniería en Producción Acuícola. Universidad de Nariño.

PATRICIA BETANCOURTH. Médico Veterinario. Técnico Laboratorio de Fisiología y Nutrición Animal. Facultad de Ciencias Pecuarias. Universidad de Nariño

SILVIO SANCHEZ FAJARDO (Q.E.P.D.). Rector Universidad de Nariño período 2007-2011.

PATRICIA AVILA. Zootecnista. MSc. Laboratorio de Calidad de Forrajes. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT - Palmira.

SIRIWAN MARTENS. Directora Laboratorio de Calidad de Forrajes. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT – Palmira.

GUSTAVO OSPINAL. Técnico de Laboratorio de Calidad de Forrajes. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT – Palmira.

BENILDA GARCIA Técnico de Laboratorio de Calidad de Forrajes. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT – Palmira.

MARIA DEL PILAR HURTADO. Química. MSc. Directora Laboratorio de Cromatografía de Gases. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT – Palmira.

SANDRA PATRICIA LOAIZA. Técnico de Laboratorio de Cromatografía de Gases. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT – Palmira.

RICARDO ROSERO NOGUERA. Zootecnista. Esp. MSc. PhD. Universidad de Antioquia.

CARLOS SERRANO WAGNER. Gerente FRIGOVITO S.A. Pasto – Nariño.

HELVER MUÑOZ FUERTES. Zootecnista. Esp. Jefe de Planta FRIGOVITO S.A. Pasto –Nariño.

ROBERT ESPAÑA DELGADO. Diseñador Industrial. Universidad de Nariño, ANDRES RODRIGUEZ ROSAS. Estudiante Ingeniería Electrónica Universidad de Nariño, JHON FREDY NARVAEZ CARLOSAMA. Estudiante Metalmecánica. Servicio Nacional de Aprendizaje. SENA.

CAMILO BOTINA, EDWIN MIGUEL CHAMORRO, DIANA ORTIZ RUEDA, WILSON PANTOJA MENA. Estudiantes del Programa de Zootécnia Universidad de Nariño.

LICETH MORALES. Secretaria programa de Zootécnia Universidad de Nariño.

MIRIAM LOZANO. Secretaria Vicerrectoría Académica Universidad de Nariño.

Y a todas y cada una de las personas que de una u otra forma contribuyeron con su valioso aporte al desarrollo y culminación exitosa de este trabajo.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	24
1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	28
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	30
3. OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GENERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4. MARCO TEÓRICO	32
4.1 GAS METANO PRODUCIDO POR LOS RUMIANTES Y SU IMPACTO SOBRE EL MEDIO AMBIENTE	32
4.1.1 Generalidades de la producción de metano en el aparato digestivo del rumiante	33
4.1.2 Origen de la producción de los gases ruminales	36
4.1.3 Población microbiana y metanogénesis	39
4.1.4 Factores que determinan la producción de metano	41
4.1.4.1 Factores Ligados al animal	41
4.1.4.2 Factores ligados a la alimentación de los rumiantes	42
4.1.4.3 Efecto de las dietas forrajeras tropicales en las emisiones de metano	45
4.1.4.4 Especies arbóreas con potencial forrajero utilizables en sistemas silvopastoriles y en la generación de servicios ambientales	46
4.2 METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PRODUCCIÓN Y EMISIONES DE METANO	48
4.2.1 Técnicas de medición	49
4.2.1.1 Técnicas cerradas	49
4.2.1 .2 Técnicas con trazadores	49

4.2.1.3 Modelos de predicción de las emisiones de metano en rumiantes	50
4.2.1.4 Ecuaciones de predicción	52
4.2.1.5 Métodos fermentativos <i>In vitro</i>	52
4.2.1.6 Rusitec (Rumen Artificial)	53
4.3 TÉCNICA <i>In vitro</i> DE PRODUCCIÓN DE GASES	55
4.3.1. Desarrollo de la técnica de producción de gas	55
4.3.2 Medición del volumen de gas	56
4.3.3 Medición de la presión de gas	57
4.3.3.1 Los sistemas semiautomáticos	58
4.3.3.2 Los sistemas automáticos	58
4.3.4 Limitaciones de la técnica de producción de gas	59
4.3.5 Aplicaciones de la Técnica de Producción de Gas	61
4.3.5.1 Predicción de la digestibilidad	61
4.3.5.2 Estudio de los constituyentes del alimento	62
4.3.5.3 Determinación de la calidad del alimento	63
4.3.5.4 Estudio de la cinética de fermentación	63
4.3.5.5 Predicción del consumo	63
5. DISEÑO METODOLÓGICO	65
5.1 LOCALIZACIÓN	65
5.2 FISIOGRAFÍA	66
5.3 METODOLOGÍA	67
5.3.1 Tipo de investigación	67
5.3.2 Trabajo de campo	67
5.3.2.1 Recolección de recursos forrajeros	67
5.3.2.2 Reconocimiento e identificación taxonómica de especies forrajeras	68
5.3.2.3 Determinación de la composición botánica del Alimento base	68

5.3.2.4 Análisis bromatológico y de metabolitos secundarios:	68
5.3.3 Montaje y adecuación de la Técnica <i>In vitro</i> de producción de gases	70
5.3.3.1 Alistamiento e instalación de materiales y equipos	70
5.3.3.2 Pesaje de muestras	71
5.3.3.3 Preparación de reactivos	72
5.3.3.4 Colección y preparación de inóculos	72
5.3.4 Trabajo de laboratorio	73
5.3.4.1 Inoculación de sustratos	73
5.3.4.2 Lecturas de presión y volumen de gas	74
5.3.4.3 Muestreo de gases para cromatografía (Determinación de metano)	74
5.3.4.4 Muestreo de sobrenadante para cromatografía (Determinación de AGV's)	74
5.3.4.5 Finalización de la prueba	74
5.3.4.6 Filtrado y secado de residuos	74
5.3.4.7 Determinación de la degradabilidad de la Materia Seca (MS) y Materia Orgánica (MO)	75
5.3.4.8 Cromatografía de gases	75
5.4 VARIABLES EVALUADAS	76
5.4.1 Composición botánica del Alimento base	76
5.4.1 Clasificación taxonómica	76
5.4.2 Contenido nutricional	77
5.4.3 Metabolitos secundarios	77
5.4.4 Producción de gas e identificación de las fracciones de metano generadas por cada dieta	77
5.4.5 Degradación <i>In vitro</i> de la materia seca (MS) y la materia orgánica (MO)	78
5.4.6 Producción de ácidos grasos volátiles (AGV's)	78
5.5 MATERIALES Y EQUIPOS	78

5.5.1 Para recolección de muestras en campo	78
5.5.2 Para trabajo de laboratorio	79
5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	81
6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	83
6.1 COMPOSICIÓN BOTÁNICA DEL ALIMENTO BASE	83
6.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	84
6.3 CONTENIDO NUTRICIONAL	87
6.4 CONTENIDO DE METABOLITOS SECUNDARIOS	93
6.5 PERFILES DE PRODUCCIÓN DE GAS DE LAS ESPECIES FORRAJERAS	97
6.6 DEGRADACIÓN <i>In vitro</i> DE LA MATERIA SECA (MS) Y LA MATERIA ORGÁNICA (MO)	109
6.7 PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES (AGV's)	114
6.8 ESQUEMAS NUTRICIONALES RECOMENDADOS PARA AMINORAR LAS PÉRDIDAS ENERGÉTICAS EN FORMA DE EMISIONES DE CH ₄ EN BOVINOS DEL TRÓPICO DE ALTURA	126
6.9.1 Control de la Metanogénesis Ruminal	126
6.9.2 Manipulación de la Fermentación Ruminal	126
6.9.2.1 Adición de lípidos	126
6.9.2.2. Adición de ionóforos	128
6.9.3 Composición de la dieta	129
6.9.3.1 Tipo de carbohidrato	129
6.9.3.2 Procesamiento de los forrajes	130
6.9.4 Sistemas Silvopastoriles	130
6.9.5 Extractos de Plantas	132
6.9.5.1 Saponinas y sarsaponinas	132
6.8.5.2 Plantas Taníferas	133
6.8.5 3 Aceites esenciales	134

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	136
7.1 CONCLUSIONES	137
7.2 RECOMENDACIONES	138
BIBLIOGRAFÍA	139
ANEXOS	152

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Potencial de calentamiento global (PCG) de diferentes gases con efecto invernadero.	33
Tabla 2. Producción de metano al nivel alimenticio de mantenimiento (Kcal de CH ₄ /100 Kcal de alimento suministrado) en relación con la digestibilidad aparente del forraje y de su tamaño de molienda	44
Tabla 3. Lugares de muestreo de las especies evaluadas	66
Tabla 4. Edad de corte de los recursos forrajeros evaluados	69
Tabla 5. Clasificación taxonómica de los recursos forrajeros evaluados	84
Tabla 6. Composición bromatológica de los recursos forrajeros evaluados (valores expresados como % en BS)	88
Tabla 7. Contenido de metabolitos secundarios de los recursos forrajeros evaluados	94
Tabla 8. Efecto del tratamiento y de la fuente de inóculo en la producción de gas	99
Tabla 9. Ecuaciones de regresión relacionando presión (psi) (X) y volumen de gas (ml) (Y) obtenidas para el laboratorio de CIENCIAS PECUARIAS UNIVERSIDAD DE NARIÑO San Juan de Pasto-Nariño	107
Tabla 10. Ecuaciones de regresión relacionando presión (psi) (X) y volumen de gas (ml) (Y) en diferentes laboratorios.	108
Tabla 11. Efecto del tratamiento y de la fuente de inóculo en la degradación de la materia seca (MS)	110
Tabla 12. Efecto del tratamiento y de la fuente de inóculo en la degradación de la materia orgánica (MO)	112
Tabla 13. Principales sistemas agroforestales pecuarios identificados en América Latina.	131

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Balance de la fermentación de azúcares en el rumen según el tipo de ácido graso volátil producido	43
Figura 2. Producción total de gas con inóculo ruminal e inóculo fecal (ml/g MS)	98
Figura 3. Perfiles de producción de gas acumulado según el tipo de inóculo empleado	103
Figura 4. Curva de calibración de CH ₄ . Relación volumen/área	104
Figura 5. Producción de CH ₄ por Kg de MS incubada a 96 horas	105
Figura 6. Relación entre presión y volumen	108
Figura 7. Degradación <i>In vitro</i> de la materia seca (MS)	110
Figura 8. Degradación <i>In vitro</i> de la materia orgánica (MO)	112
Figura 9. Curva de calibración Ácido Acético	115
Figura 10. Curva de calibración Ácido Propiónico	116
Figura 11. Curva de calibración Ácido Butírico	116
Figura 12. Producción de AGV's con inóculo ruminal	117
Figura 13. Producción de AGV's con inóculo fecal	118
Figura 14. Producción total de AGV's ml/L	119
Figura 15. Relación molar Acetato : Propionato con Inóculo Ruminal	123
Figura 16. Relación molar Acetato : Propionato con Inóculo Fecal	123

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Protocolo Técnica In vitro de producción de gases	153
Anexo B. Especies forrajeras evaluadas	166
Anexo C. Análisis Estadístico	173

GLOSARIO

ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES (AGV's): son componentes orgánicos (pequeñas moléculas que se unen para formar largas cadenas) de los lípidos que proporcionan energía al cuerpo y permiten el desarrollo de los tejidos.

ANTROPOGÉNICO: hechos por el hombre o como resultado de actividades humanas. Normalmente utilizado en el marco de las emisiones que son producidas como resultado de actividades humanas.

DEGRADABILIDAD: descomposición de una sustancia por rotura de los enlaces que unen los elementos químicos que la forman. Puede producirse por la acción del oxígeno, la luz, el calor y ciertos microorganismos.

EMISIONES: liberación de contaminantes (partículas sólidas, líquidas o gases) al medio procedentes de una fuente productora. El nivel de emisión de una fuente se mide por las cantidades emitidas por unidad de tiempo (toneladas/año).

ESTEQUIOMETRIA: es el cálculo de las relaciones cuantitativas entre reactivos y productos en el transcurso de una reacción química.

FERMENTACIÓN RUMINAL: es un proceso digestivo por medio del cual los microorganismos descomponen los carbohidratos en moléculas simples para la absorción hacia el torrente sanguíneo de un animal. Durante este proceso se producen grandes cantidades de gas de metano.

FORRAJES: cultivos vegetales destinados a la alimentación animal.

GAS: es el estado de agregación de la materia que no tiene forma ni volumen propio.

GASES DE EFECTO INVERNADERO (GEI): gas que al estar presente en la atmósfera refleja hacia la tierra la radiación infrarroja emitida por ésta, provocando un calentamiento de la propia tierra y su atmósfera.

In vitro: experimentos que se llevan a cabo en el laboratorio. En latín significa "en el vidrio".

INCUBACIÓN: es la función común de crear un ambiente con la humedad y temperatura adecuadas para el crecimiento o reproducción de microorganismos y organismos superiores.

INOCULACIÓN: introducción de un microorganismo en un medio de cultivo o en un organismo vivo.

INÓCULO: material usado para iniciar un cultivo, proceso o fermentación microbiana.

METANO (CH₄): hidrocarburo que es un gas de efecto invernadero con un potencial de calentamiento global, según estimaciones recientes 23 veces mayor que el del dióxido de carbono (CO₂).

METANÓGENOS: microorganismos procariontes que viven en medios estrictamente anaerobios y que obtienen energía mediante la producción de metano (CH₄).

METANOGENÉISIS: es una forma de metabolismo microbiano muy importante, donde se da la formación de metano.

REPETIBILIDAD: grado de concordancia entre los resultados de mediciones o ensayos sucesivos de una misma característica, obtenidos con el mismo método, por el mismo observador, con los mismos instrumentos de medida o ensayo, en el mismo laboratorio y a intervalos de tiempo conocidos.

SAPONINAS: son glucósidos de esteroides o de triterpenoides, llamadas así por sus propiedades como las del jabón: cada molécula está constituida por un elemento soluble en lípidos (el esteroide o el triterpenoide) y un elemento soluble en agua (el azúcar), y forman una espuma cuando son agitadas en agua.

SUSTRATO: un sustrato es una molécula sobre la que actúa una enzima o también se considera como la superficie en la que un organismo animal vive, crece y se reproduce.

TANINOS: compuestos fenólicos de origen vegetal que contienen C, H y O, de sabor astringente.

TRANSDUCTOR: término general para un dispositivo que recibe información en forma de uno o más cuantificadores físicos, modificadores de información y produce una señal de salida resultante.

CARACTERIZACIÓN DE RECURSOS FORRAJEROS HERBÁCEOS, ARBÓREOS Y ARBUSTIVOS DE USO CONVENCIONAL FRENTE A LOS DE USO ALTERNATIVO ENCONTRADOS EN LA ZONA DE INFLUENCIA DE LA GRANJA LECHERA CHIMANGUAL UNIVERSIDAD DE NARIÑO, MEDIANTE EL USO DE LA TÉCNICA *In vitro* DE PRODUCCIÓN DE GASES

RESUMEN

Esta investigación tuvo como enfoque principal la caracterización de recursos forrajeros herbáceos, arbóreos y arbustivos presentes en la zona de influencia de la granja lechera Chimangual, la cual se encuentra ubicada en el corregimiento de Panamal, vereda la Verbena, municipio de Sapuyes, distante 18 kilómetros de la ciudad de Túquerres, esta cuenta con una altura de 3150 msnm, temperatura promedio de 9°C, humedad relativa del 85% y precipitación de 1250 mm anuales.

Se evaluó mediante la técnica *In vitro* de producción de gases la mezcla de forrajes que componen el alimento base de los bovinos de la granja y 12 especies forrajeras adicionales (*Lolium multiflorum*, *Medicago sativa*, *Phalaris arundinacea*, *Otholobium munityense*, *Baccharis latifolia*, *Abutilon striatum van*, *Acacia decurrens*, *Raphanus sativus L*, *Sambucus nigra*, *Ambrosia arborescens*, *Beta vulgaris* follaje y fruto), las cuales fueron inoculadas con líquido ruminal y heces bovinas frescas en dos grupos de análisis. La presión generada por los gases acumulados en la parte superior de las botellas en incubación fue medida con un transductor de presión conectado a un lector digital. El volumen de gas fue determinado mediante extracción con una jeringa hasta el momento en que la presión registrada en el lector fue cero. Las mediciones de la producción de gas se efectuaron en las horas 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 19, 24, 30, 36, 48, 72 y 96 del proceso, encontrándose diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para un mismo inóculo en cuanto a la producción total acumulada de gases, más no entre inóculos para un mismo tratamiento. La mayor producción de gas, a las 96 horas, en el fruto de *Beta vulgaris* fue de 151,73 ml y 141,18 ml con inóculo ruminal e inóculo fecal respectivamente, mientras que el menor registro de producción, se obtuvo en la *Acacia decurrens* con 112,97 ml y 102,76 ml de gas con ambos inóculos.

Para el análisis estadístico de esta variable se empleó un modelo de medidas repetidas en el tiempo PROC MIXED del programa SAS 9.1. Las medias se ajustaron y compararon según la prueba de Tukey – Kramer. El mismo análisis fue empleado para la evaluación de la degradación de materia seca (MS) y materia

orgánica (MO). Estas variables fueron determinadas a la hora 6 y 96 del proceso de incubación, mediante el secado y posterior incineración de los residuos de las muestras evaluadas y el cálculo por diferencia de los pesajes registrados. Los mayores valores de degradación de la MS y MO se obtuvieron con el fruto de *Beta vulgaris* con los dos inóculos y en los dos horarios de muestreo (MS= 11,92%, 12,25%, 95,32% 98,0%), (MO= 11,79%, 11,64%, 94,30%, 93,15%) en tanto que los menores valores fueron para *Acacia decurrens* (MS= 4,88%, 6,01%, 39,03% 48,10%), (MO= 3,85%, 4,04%, 30,78%, 32,34%).

La determinación de metano se realizó por cromatografía de gases, donde los valores más altos correspondieron al fruto de *Beta vulgaris* (109,23ml – 129,10ml) tanto con inóculo ruminal como fecal, menores valores se observaron en *Medicago Sativa* (55,55ml - 53,13ml), mientras que los valores más bajos de producción de metano, se registraron para *Acacia decurrens* (3,09ml–5,08ml), *Ambrosia arborescens* (5,39ml–10,84ml), *Otholobium munitense* (6,16ml–8,41ml) y *Sambucus nigra* (12,15ml–9,11ml), con inóculo ruminal y fecal respectivamente, especies que registraron presencia de taninos en el análisis de metabolitos secundarios.

La cuantificación de Ácidos Grasos Volátiles (AGV's), se realizó mediante cromatografía de gases por inyección líquida. La mayor producción de ácido acético fue para *Abutilón striatum van* (980,67 ml/L) con inóculo ruminal y fruto de *Beta vulgaris* (747,93 ml/L) con inóculo fecal, de ácido Propiónico para *Abutilón striatum van* (1232,91 ml/L) en el grupo de inóculo ruminal y para *Sambucus nigra* (696,77ml/L) en el grupo de inóculo fecal. La mayor relación ácido Acético-ácido Propiónico se estableció para el fruto de *Beta vulgaris* con los dos inóculos (2,35 – 2,13).

Adicionalmente, se analizó la composición botánica de la pradera de la cual se tomó la muestra para el tratamiento testigo, se evaluó la composición nutricional de todos los forrajes en estudio, por medio de análisis químico proximal y la presencia de taninos, esteroides, saponinas y alcaloides como metabolitos secundarios por medio de un sistema cualitativo de cruces (+/-).

Los 1800 datos obtenidos en la investigación correspondientes al registro de presión y volumen de los trece forrajes incubados con los dos inóculos y en los quince horarios de lectura, permitieron la obtención de una ecuación de regresión, utilizando el complemento PROC REG del programa estadístico SAS 9.1, la que mediante correlación entre presión y volumen generados durante la incubación

permitió establecer las condiciones según la altura sobre el nivel del mar del Laboratorio de Fisiología y Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Universidad de Nariño, lo que se constituye en referente para posteriores investigaciones.

Palabras clave: Cinética de digestión, Fermentación, Metano, Producción de gas, Recurso forrajero, Rumiantes, Taninos, Técnica *In vitro*,

**CHARACTERIZATION OF FORAGES CROPS, TREES AND SHRUBS USE
CONVENTIONAL VERSUS ALTERNATIVE USE FOUND IN THE ZONE OF
INFLUENCE OF THE DAIRY FARM CHIMANGUAL UNIVERSITY OF NARIÑO,
USING THE TECHNIQUE *In vitro* GAS PRODUCTION.**

ABSTRACT

The main focus of research was the characterization of forages crops, trees and shrubs in the area of influence Chimangual dairy farm, which is located in the village of Panamal, Verbena village, municipality of Sapuyes, distant 18 km City Túquerres, this has a height of 3150 mosl, average temperature of 9 °C, relative humidity of 85% and annual precipitation of 1250 mm.

Technique was evaluated by *In vitro* gas production of feed mixture comprising the staple food of the cattle farm and 12 additional forage species (*Lolium multiflorum*, *Medicago sativa*, *Phalaris arundinacea*, *Otholobium munyense*, *Baccharis latifolia*, *Abutilon striatum* var, *Acacia decurrens*, *Raphanus sativus* L, *Sambucus nigra*, *Ambrosia arborescens*, *Beta vulgaris* foliage and fruit) were inoculated with bovine rumen fluid and fresh faeces in two focus groups. The pressure generated by the gas at the top of the incubation bottles was measured with a pressure transducer connected to a digital readout. The volume of gas was extracted with a syringe until the pressure was registered in the reader zero. Measurements of gas production were made in the hours 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 19, 24, 30, 36, 48, 72 and 96 of the process, found statistically significant differences ($p < 0,05$) between treatments for the same inoculum as the total cumulative gas production, but not between inocula for the same treatment. Increased production of gas, at 96 am in the fruit of *Beta vulgaris* was 151.73 ml and 141.18 ml rumen inoculum and inoculum fecal respectively, while the lowest production record was obtained in the *Acacia decurrens* with ml and 102.76 ml 112.97 gas with both inocula.

For statistical analysis of this variable is used a repeated measures model in PROC MIXED program while SAS 9.1. Means were adjusted and compared according to Tukey - Kramer. The same analysis was used to evaluate the degradation of dry matter (DM) and organic matter (OM). These variables were determined at 6 o'clock and 96 of incubation by subsequent drying and incineration of waste samples tested and the calculation by difference in the recorded weighings. The highest values of DM degradation and MO were obtained with the fruit of *Beta vulgaris* with the two inocula and at both sampling times (MS = 11.92%, 12.25% 95.32% 98.0%), (MO = 11.79%, 11.64%, 94.30%, 93.15%) while

the lowest values were for *Acacia decurrens* (MS = 4.88%, 6.01%, 39, 03% 48.10%) (MO = 3.85%, 4.04%, 30.78%, 32.34%).

The determination of methane was performed by gas chromatography, where the highest values were the fruit of *Beta vulgaris* (109.23 ml - 129.10 ml) with both ruminal and fecal inoculum, lower values were observed in *Medicago Sativa* (55.55 ml - 53.13 ml), while the lowest values of methane production were recorded for *Acacia decurrens* (3.09 ml-5, 08ml), *Ambrosia arborescens* (5.39 ml-10, 84ml), *Otholobium munyense* (6.16 ml- 8.41 ml) and *Sambucus nigra* (12.15 ml-9, 11ml) with ruminal and fecal inoculum, respectively, species that showed presence of tannins in the analysis of secondary metabolites.

The quantification of volatile fatty acids (VFA's), was performed by gas chromatography liquid injection. Increased production of acetic acid was for *Abutilon striatum van* (980.67 ml / L) with ruminal inoculum and fruit of *Beta vulgaris* (747.93 ml / L) with fecal inoculum of propionic acid for *Abutilon striatum van* (1232.91 ml / L) in the rumen inoculum and *Sambucus nigra* (696.77 ml / L) in the fecal inoculum. Most relationship Propionic acid Acetic acid was established for the fruit of *Beta vulgaris* with the two inocula (2.35 to 2.13).

Additionally, we analyzed the botanical composition of meadow which the sample was taken for the control treatment, we assessed the nutritional composition of all forages under study, through proximal chemical analysis and the presence of tannins, sterols, saponins and alkaloids as secondary metabolites by means of a qualitative cross (+/-).

The 1800 research data relating to registration of pressure and volume of the thirteen forages incubated with the two inocula and fifteen hours of reading, allowed obtaining a regression equation using PROC REG Plug SAS 9.1 statistical program , which by correlation between pressure and volume generated during the incubation allowed to establish the conditions in the height above sea level of the Laboratory of Physiology and Animal Nutrition, Faculty of Animal Science at the University of Nariño, which is a reference for further research.

Keywords: Kinetics of digestion, fermentation, methane, gas production, feed resource, ruminants, tannins, *In vitro* techniques.

INTRODUCCIÓN

Colombia, es un importante productor ganadero, ubicándose entre los primeros 13 productores a nivel mundial, con una participación cercana al 2% del total. Posee además el cuarto hato ganadero más grande de América Latina con un inventario bovino de 23,6 millones de cabezas en cerca de 40 millones de hectáreas en el año 2008 según PROEXPORT 2010¹, con cuya actividad aporta alrededor del 3,6% al PIB nacional, el que a su vez representa una participación del 27% del PIB agropecuario y del 64% del PIB pecuario según cifras consignadas en el Plan Estratégico de la Ganadería Colombiana-PEGA 2019².

La agricultura y la ganadería se han establecido como la base económica del Departamento de Nariño. Según el Plan de Desarrollo Departamental³, el inventario ganadero en Nariño asciende a 254 mil cabezas, de las cuales el 16% corresponde a lechería especializada, el 61% a lechería tradicional y el 23% a ceba integral; en efecto, los nariñenses se han caracterizado por ser un pueblo esencialmente rural, en donde predomina la producción minifundista, y en donde actividades como la ganadería se constituyen en la principal fuente de sustento económico y generación de productos de autoconsumo para un importante número de familias de la zona rural.

Es común que una significativa cantidad de las gramíneas empleadas en la alimentación de rumiantes, las cuales debido a efectos ambientales y de edad, asociados con baja calidad nutritiva en cuanto a proteína y carbohidratos solubles, avanzado estado de maduración y alto contenido lignocelulósico además de una elevada tasa de pasaje a través del tracto gastrointestinal presentan bajos niveles de degradabilidad ruminal, esto se explica por medio de una fermentación microbiana deficiente cuyo resultado se refleja en un flujo y absorción de nutrientes inferior a la que requieren los rumiantes. Todo esto conlleva al desarrollo de diversos procesos metabólicos que promueven la formación de

¹ PROEXPORT – FEDEGAN. Abriendo puertas, cerrando negocios. Sector cárnico en Colombia. [En línea]. Bogotá, enero de 2010; [citado 17 de agosto de 2011]. Disponible en internet: <[http://www.inviertaencolombia.com.co/Adjuntos/294_\(Microsoft%20Word%20%20PerfilCarnicoEspa.pdf](http://www.inviertaencolombia.com.co/Adjuntos/294_(Microsoft%20Word%20%20PerfilCarnicoEspa.pdf)>

² FEDERACION COLOMBIANA DE GANADEROS – FEDEGAN. Plan Estratégico de la Ganadería Colombiana PEGA 2019. Por una ganadería moderna y solidaria. Santa fe de Bogotá, Colombia. Noviembre de 2006. p 296

³ COLOMBIA, MINISTERIO DE AGRICULTURA, Gobernación de Nariño. Consolidado agropecuario 2005, San Juan de Pasto, 2006. p. 86-87.

compuestos necesarios para el mantenimiento de la microbiota ruminal donde se ve afectada la relación de ácidos grasos volátiles (AGV's) producidos, que regulan la producción de hidrógeno y la mayor producción de metano en el rumen⁴.

De acuerdo con Hess *et al*⁵, 2003 si se excluye la deficiencia de nitrógeno en el rumen se puede aumentar la actividad de los microorganismos ruminales, resultando en una mejor degradación de los forrajes pero también en un aumento en la emisión de metano.

De acuerdo con Montenegro y Abarca citados por Carmona *et al*⁶, el ganado bovino emite metano debido a que en el proceso digestivo que ocurre bajo condiciones anaeróbicas participan diferentes tipos de bacterias, las que degradan la celulosa ingerida a glucosa que fermentan después a ácido acético y reducen el dióxido de carbono formando metano en el proceso.

Aunado a lo anterior, Primavesi *et al*⁷, atribuyen a la agricultura y la producción pecuaria, una gran contribución a las emisiones de metano (CH₄), dióxido de carbono (CO₂) y óxido nitroso (N₂O) a la atmósfera, cuyo aumento en las concentraciones de estos gases provoca un calentamiento de la superficie terrestre y la destrucción de la capa de ozono.

⁴ CARMONA Juan C., BOLIVAR, Diana., GIRALDO, Luis A. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. En: Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Vol. 18:1, 2005, p 49 – 63.

⁵ HESS, Hans D., STURM, Christoph D. y TIEMANN, Tassilo T. Dinámica de fermentación ruminal de mezclas de leguminosas con contenidos y tipos de taninos contrastantes. En: Segundo taller de Taninos en la nutrición de rumiantes en Colombia. Bogotá. Noviembre 30 y diciembre 01 de 2006. p. 27-29

⁶ CARMONA J. C., *et al*. 2005. Op. cit., p. 52

⁷ PRIMAVESI O. *et al*. Metano entérico de bovinos. En: Leiteiros em condições tropicais brasileiras. Pesq agropec bras. Vol 12 (2). 2004. p. 277-283.

Informes expuesto por la Food and Agriculture Organization FAO 2001⁸-2006⁹ señalan que la producción pecuaria es una de las causas que generan problemas ambientales de gran impacto en el mundo, como lo son el calentamiento del planeta, la degradación de las tierras, la contaminación atmosférica junto a la del agua y la pérdida de biodiversidad. Los rumiantes domésticos, los incendios forestales, el cultivo de arroz en los humedales y los productos de desecho producen la mayor parte del metano que hay en la atmosfera, a la vez que la labranza convencional y la utilización de fertilizantes generan el 70% de los óxidos nitrosos.

No obstante investigadores en gran parte del mundo se han preocupado desde hace ya algunas décadas por tan delicada problemática, llevándolos a desarrollar alternativas de alimentación y manipulación de las dietas empleadas en rumiantes con fines de mitigar estos negativos impactos en el medio ambiente por parte del desarrollo de la ganadería.

Con base a investigaciones desarrolladas por diversos autores; técnicas como la adición de grasas e ionóforos como la monensina en la dieta, la inclusión de leguminosas con taninos, además del tipo de carbohidrato empleado o el procesamiento de los forrajes, el uso de sistemas silvopastoriles en los sistemas de manejo, se constituyen en alternativas de disminución de la producción de gases como el metano¹⁰.

Estudios desarrollados por Hess *et al*¹¹ revelan reducción en las emisiones de metano con el uso del fruto del árbol tropical *sapindus saponaria*.

⁸ FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, FAO. Agricultura y el cambio climático. [En línea] Revista Agro 21. [citado 9 de Agosto de 2011]. Disponible en internet: <<http://www.fao.org/ag/esp/revista/0103sp2.htm>>

⁹ FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, FAO. Las repercusiones del ganado en el medio ambiente, el desafío estriba en reconciliar dos demandas: la de productos animales y la de servicios ambientales. [En línea]. 2006. [consultado en 09 de Agosto de 2011]. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/esp/revista/0612sp1.htm>.

¹⁰ BERNAL, B. Laila C. Efecto de las mezclas de las leguminosas *Calliandra calothyrsus*, *Flemingia macrophylla*, *Cratylia argétea* y *Vigna unguiculata* ensiladas y henificadas sobre los parámetros de fermentación ruminal *In vitro* y producción de leche en bovinos. Palmira – Valle del Cauca. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela de Postgrados. Tesis de grado presentada como requisito para optar al título de Magíster en Ciencias Agrarias con énfasis en producción animal tropical. 2007. 119 p.

¹¹ HESS H.D., STURM C.D. y TIEMANN T.T. 2006. Op. cit., p. 27-29

Investigaciones financiadas por el Swiss Centre for International Agriculture Schweizerisches, the Zentrum für Internationale Landwirtschaft and the Centre Suisse pour l'Agriculture Internationale, en convenio con el Centro internacional de Agricultura Tropical CIAT, Corpoica y la Universidad de Antioquia, se han enfocado en la importancia del uso de leguminosas arbustivas y arbóreas con altas concentraciones de taninos condensados como estrategia para disminuir la emisión de metano por parte de los rumiantes¹².

Investigaciones adicionales desarrolladas en el CIAT-Palmira Valle del Cauca¹³, señalan que el uso de leguminosas como *Calliandra calothyrsus* puede reducir la producción del gas hasta en un 50% si se compara con una dieta de pasto solo.

Ante dichas circunstancias, resulta urgente estudiar, evaluar y recomendar especies promisorias para sistemas agroecológicos específicos y sistemas de producción pecuaria tanto en función de productividad de biomasa, como de su valor nutritivo y de beneficios adicionales sobre la sostenibilidad ambiental.

Con base en las anteriores consideraciones este trabajo de investigación empleó la técnica *In vitro* de producción de gases descrita por Posada y Noguera,¹⁴ con la finalidad de evaluar la producción gaseosa de los recursos forrajeros de la zona de influencia de la granja lechera Chimangual, lo que permitió la caracterización de dichas dietas, con fines de emitir recomendaciones que además de mejorar la dieta del ganado lechero, permitan el aprovechamiento de especies propias de la zona de vida donde se desarrolla la ganadería en el departamento; además de optimizar su eficiencia productiva y reducir de esta manera las emisiones de gases que mayor impacto generan en el ambiente.

¹² TIEMANN, Tassilo., HESS, Hans D., LASCANO, Carlos. Leguminosas arbustivas con taninos: Potencial y limitaciones para la alimentación del ganado en el trópico. Swiss Centre for International Agriculture Schweizerisches, Zentrum für Internationale Landwirtschaft and the Centre Suisse pour l'Agriculture Internationale, Centro internacional de Agricultura Tropical CIAT, Corpoica y Universidad de Antioquia. Palmira, Junio de 2006.

¹³ BERNAL B., Laila C. Op. cit. p 23-26.

¹⁴ POSADA, Sandra Lucia., NOGUERA, Ricardo. Técnica *In vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. [en línea], 2005. En: Livestock Research for Rural Development. [citado 05 de Febrero de 2010]. Disponible en internet: <<http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd17/4/posa17036.htm>>

1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

McCaughey *et al*, afirman que «las emisiones de metano generadas por los rumiantes tienen un efecto medioambiental significativo, pues contribuyen al calentamiento global y ocasionan una disminución de la capa de ozono, tales aspectos conllevan a cambios climáticos que afectan drásticamente el equilibrio ecológico del planeta»¹⁵.

Un aspecto común en los sistemas de producción ganadera del Trópico Alto Andino nariñense, es la energía alimenticia que se transforma en gas metano, que no es aprovechada por el animal, razón por la cual se desperdician nutrientes, que se podrían destinar a mejorar la calidad y la cantidad de la producción lechera.

Para Carmona *et al*¹⁶, el mayor limitante en la producción bovina de los países en desarrollo es la fluctuación en la cantidad y calidad de los recursos forrajeros, por tanto, la descripción de los alimentos en términos de la cinética de digestión provee una base útil para su evaluación y eficiente utilización.

Así pues, la implementación de dietas alimentarias en la producción bovina debe ser coherente con las condiciones y necesidades del trópico, basándose en la búsqueda de alternativas factibles, que aprovechen los recursos locales y que se encaminen en aras por mejorar las características de la dieta y con ello, los parámetros fermentativos y productivos del ganado

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, se hace necesario conocer los efectos generados por la inclusión de especies forrajeras arbóreas y arbustivas, sobre la nutrición y el metabolismo ruminal de los bovinos lecheros del trópico Alto Andino del departamento de Nariño, para esto, se planteó una evaluación de la producción de gases, que permita estimar la emisión gaseosa y pérdida energética bajo el uso de estas especies. Con base en dicha información, plantear

¹⁵ Mc CAUGHEY W., WITTENBERG K., CORRIGAN D. Methane production by steers on pasture. Journal Animal Science. Vol. 2 (31) 1997. p. 519-524.

¹⁶ CARMONA J. C., *et al*. 2005. Op. cit., p. 52.

recomendaciones y diseñar estrategias de alimentación, suplementación y manejo de praderas, las cuales no solo se enfoquen en maximizar la producción, sino que promuevan la sostenibilidad y la rentabilidad del sector, con la perspectiva de transformar la ganadería del departamento en una actividad eficiente dentro de un contexto ambientalista, renovador y limpio, con mínimos impactos ambientales.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Ante la realidad que implica que la ganadería desarrollada en el trópico está contribuyendo a pasos agigantados en el impacto desfavorable para el medio ambiente, es posible considerar la alternativa de disminuir la población bovina, todo esto en aras de reducir los efectos medioambientales en el trópico, donde la baja productividad por condiciones edáficas y la baja disponibilidad de recursos alimenticios de buena calidad son una constante. No obstante frente al incremento de la población humana mundial principalmente en los países tropicales, junto a la demanda de un alto suministro de fuentes alimenticias de origen animal —esta alternativa no resulta viable— por lo cual, se hace necesario establecer sistemas de producción ganadera, agrícola y forestal, que intervengan en la protección del medio ambiente.

¿Qué potencial de producción de gases con efecto invernadero como el metano, tienen las dietas comúnmente empleadas en la alimentación de bovinos lecheros del trópico alto andino nariñense y qué alternativas de alimentación podrían contribuir a mitigar dichos efectos negativos en el ambiente?

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar mediante la Técnica *In vitro* de producción de gases, las emisiones producidas por los recursos forrajeros empleados en la alimentación de bovinos lecheros.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar botánica, taxonómica, nutricional y fitoquímicamente los recursos forrajeros evaluados.
- Evaluar la producción gaseosa de los forrajes de uso convencional y contrastar los resultados obtenidos con la generada por los de uso alternativo en la zona de influencia de la granja lechera Chimangual.
- Determinar qué tipo de dietas son las que menores pérdidas energéticas producen en la ganadería de Chimangual.
- Establecer los posibles factores asociados a los mayores índices de emisiones gaseosas.
- Proponer un esquema de manejo alimentario que favorezca la productividad con menor impacto ambiental.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 GAS METANO PRODUCIDO POR LOS RUMIANTES Y SU IMPACTO SOBRE EL MEDIO AMBIENTE

Para Montenegro y Abarca¹⁷, Los bovinos poseen un sistema digestivo que tiene la capacidad de aprovechar y convertir material fibroso con altos contenidos de carbohidratos estructurales, en alimentos de alta calidad nutritiva, la carne y la leche. Sin embargo por sus características innatas, este mismo sistema digestivo también produce metano, un potente gas con efecto invernadero que contribuye con aproximadamente el 18% del calentamiento global ocasionado por actividades productivas con animales domésticos, superado sólo por el CO₂.

—En los últimos años el gas metano ha cobrado gran importancia en la producción animal, debido a los efectos negativos asociados con en el medio ambiente—.

Johnson y Johnson¹⁸ señalan, que el metano colabora en los efectos climáticos directamente a través de su interacción con la energía infrarroja, e indirectamente a través de las reacciones de oxidación atmosféricas que producen CO₂. Por esto, se considera que en la actualidad los sistemas de producción animal sostenibles deben propender por una menor producción de metano¹⁹.

Primavesi *et al*,²⁰ postula que la agricultura y la producción pecuaria contribuyen ampliamente a las emisiones antropogénicas de metano (CH₄), dióxido de carbono

¹⁷ MONTENEGRO, Johnny., ABARCA, Sergio. Fijación de carbono, emisión de metano y de óxido nitroso en sistemas de producción bovina en Costa Rica. En: Intensificación de la ganadería en Centroamérica: beneficios económicos y ambientales. CATIE – FAO – SIDE. Ed Nuestra Tierra. 2000. 334 p.

¹⁸ JOHNSON K, A., JOHNSON D, E. Methane emissions from cattle. J Anim Sci, 1995; 73: 2483-2492.

¹⁹ CARMONA J. C., *et al*. 2005. Op. cit., p. 56.

²⁰ PRIMAVESI O, SHIRAISHI RT, DOS SANTOS M, APARECIDA M, TERESINHA T, FRANKLIN P. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. Pesq agropec bras, 2004 39 (3): 277-283.

(CO₂) y óxido nitroso (N₂O) a la atmósfera. El aumento de las concentraciones de estos gases provoca un calentamiento de la superficie terrestre y la destrucción de la capa de ozono en la estratosfera.

Dentro de la gama de gases a los que se les atribuye efecto invernadero, se considera el CO₂ el más abundante y el que actualmente tiene un mayor aporte al incremento del calentamiento global.

McCaughey²¹, plantea que las concentraciones de metano son inferiores a las de CO₂, sin embargo el primero, está incrementando rápidamente y además posee un efecto 21-30 veces más contaminante con respecto al CO₂, considerándose que en el tiempo el metano pueda ser predominante.

Para Van Soest²², existen también diferencias notables entre estos gases, en cuanto a su vida media en la atmosfera, que es notablemente más corta para el metano (10 – 20 años) que para el CO₂ (50 – 200 años) y el óxido nitroso (100 – 150 años). Como consecuencia, ha enfatizado el interés en priorizar la actuación sobre las emisiones de metano, por tener una repercusión más rápida en la reducción del efecto invernadero.

Tabla 1. Potencial de calentamiento global (PCG) de diferentes gases con efecto invernadero

Gas	PCG
Dióxido de carbono (CO ₂)	1
Metano (CH ₄)	21
Óxido Nitroso (N ₂ O)	310
Clorofluorcarbonatos (CFC)	140 – 11.700

Fuente: HACALA 2006.

4.1.1 Generalidades de la producción de metano en el aparato digestivo del rumiante. El rumiante suministra los nutrientes que permiten el crecimiento y desarrollo de los microorganismos ruminales. Todo el C, N, P, S y elementos traza

²¹ McCAUGHEY W, WITTENBERG K, CORRIGAN D. Methane production by steers on pasture. Can J An Sc, 1997; 76 (3): 519-524.

²² VAN SOEST, P.J. Nutritional Ecology of the Ruminant. 2° Ed. Comstock. Cornell University Press. 476 p.

necesarios son aportados por el alimento que consume el animal. También el rumiante contribuye sustancialmente a mantener las condiciones fisicoquímicas apropiadas para este medio fermentativo, por ejemplo contribuye al control de la temperatura, pH y al control de la dinámica de reciclaje de los compuestos en el rumen.²³

Carmona *et al*²⁴, infiere que la eliminación de metano vía eructo en el ganado, inicia aproximadamente a las cuatro semanas de vida, cuando los alimentos sólidos empiezan a ser retenidos en el retículo-rumen, aumentándose la fermentación y la producción de gases a medida que el retículo-rumen se va desarrollando.

De Ramus *et al*²⁵, reportan en sus investigaciones, que las emisiones anuales de metano por novillas de carne en pastoreo estuvieron entre 32 y 83 kg. Y entre 60 y 95 kg. Para vacas adultas, que pastoreaban diferentes tipos de praderas. El dato más alto en cada tipo de animal, corresponde a gramíneas de baja calidad nutricional, con sistemas de pastoreo continuo y baja disponibilidad forrajera, mientras que los datos más bajos corresponden a praderas mejoradas, a sistemas de pastoreo rotacional, fertilización y con alta disponibilidad de forraje. En estos reportes, se observa, que de acuerdo a las condiciones de la dieta, las emisiones de metano pueden variar ampliamente, indicando que las características nutricionales de la pastura tienen un efecto marcado en la producción de dicho gas.

McCaughey *et al*²⁶, reportan que el 87% de la producción de metano se produce en el rumen, y 13% en el tracto digestivo posterior. De este último, aproximadamente el 89% es absorbido hacia la sangre y expirado a través de los

²³ METABOLISMO DE los carbohidratos en el rumen. Monografías de Medicina Veterinaria, Vol.5, N°2, diciembre 1983. [citado 5 de Mayo de 2011]. Disponible en <http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/CDA/mon_vet_simple/0,1420,SCID%253D7693%2526ISID%253D410%2526PRT%253D7627,00.html>

²⁴ CARMONA J. C., *et al.* 2005. Op. cit., p. 32

²⁵ DE RAMUS HA, CLEMENT TC, GIAMPOLA DD, DICKISON PC. Methane emissions of beef cattle on forages: efficiency of grazing management systems. Journal Environ Qual, 2003; 32: 269-277.

²⁶ McCAUGHEY W, WITTENBERG K, CORRIGAN D. Impact of pasture type on methane production by lactating beef cows. Can J An Sc, 1999; 79 (2): 221-226.

pulmones. Esto indica que cerca del 98% del total de metano producido por los rumiantes puede ser expirado a través de la boca y los orificios nasales.

Para Leng²⁷, en los sistemas ganaderos tropicales, las pasturas presentan pérdida de nutrientes (proteína y minerales) durante ciertas épocas del año, que determinan la baja eficiencia del ecosistema ruminal en la síntesis de proteína microbiana. Las características de la dieta que disminuyen la tasa de degradación o aumentan el tiempo de retención ruminal, elevan la cantidad de metano producido por unidad de dieta consumida. En estas condiciones, la producción de metano puede representar del 15.0% al 18.0% de la energía digestible consumida y la corrección de estas deficiencias pueden reducir las emisiones a niveles tan bajos como el 7.0%.

Ospina²⁸, plantea que la suplementación estratégica de rumiantes en pastoreo puede corregir las posibles deficiencias de nutrientes para el crecimiento microbiano y reducir la emisión de metano.

Johnson y Johnson indican, que «los dos principales factores responsables de las variaciones en la producción de metano son: la cantidad de carbohidratos fermentados en el retículo-rumen, lo cual implica diversas interacciones dieta-animal, que afectan el balance entre las tasas de fermentación de estos carbohidratos y la tasa de pasaje»²⁹.

El otro mecanismo consiste en la relación de ácidos grasos volátiles (AGV) producidos, regulando la producción de hidrógeno y la subsecuente producción de metano. El aspecto de mayor impacto en la metanogénesis es la relación ácido acético-ácido propiónico. Si esta relación llega a 0.5 la pérdida energética puede ser de 0%. Pero si todos los carbohidratos fuesen fermentados a ácido acético y no se produjera propiónico, las pérdidas energéticas podrían llegar a ser del 33%. La relación acético:propiónico puede variar entre 0.9 a 4, por lo tanto las pérdidas por metano varían ampliamente.

²⁷ LENG, Ron, A. Ruminant production and greenhouse gas emissions. Proceedings of the New Zealand of Animal Production. 1992. p 52

²⁸ OSPINA, Harold., GIL Jorge Luis. Desafíos Socio-Económicos y Ambientales en los Sistemas Ganaderos del Futuro. En: Revista Comité de ganaderos del centro y norte del Valle, Cogancevalle. Dic. 18 de 2010. Vol. 71. p 23.

²⁹ JOHNSON K.A., JOHNSON D.E. Op. cit., p. 45-46

4.1.2 Origen de la producción de los gases ruminales. De acuerdo con lo anteriormente mencionado, la producción ganadera es responsable directa o indirectamente de una proporción relevante de las emisiones de metano a la atmósfera.

Según la Federación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal, FEDNA:

El gas metano se forma como resultado de la fermentación de una parte del alimento por parte de la flora microbiana residente en el aparato digestivo de los animales. De esa fermentación los microorganismos obtienen energía que precisan para sus funciones vitales. El sustrato para estos procesos fermentativos son cadenas carbonadas procedentes principalmente de la hidrólisis de los carbohidratos del alimento.

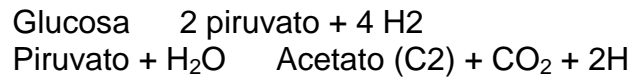
Los microorganismos disponen de enzimas capaces de actuar no solo sobre los carbohidratos solubles, sino también sobre los carbohidratos estructurales que forman parte de la pared celular de las plantas (fracción fibrosa), el resultado de la hidrólisis de los polisacáridos son sus azúcares constituyentes, de forma que tanto el almidón como la celulosa dan lugar a la liberación de glucosa como resultado final de este proceso. Análogamente, la hidrólisis de hemicelulosas, pectinas y fructanos dan lugar respectivamente a la formación de pentosas, ácidos urónicos o fructosa. —No todos los componentes hidrocarbonados del alimento son igualmente hidrolizables— los principales factores que condicionan la eficacia del proceso son el grado de lignificación de la fibra, que dificulta la acción de los microorganismos y el tiempo de que dispongan estos para realizar la digestión.

En una segunda etapa, la flora digestiva fermenta los azúcares liberados dando lugar como producto final a la formación de ácidos grasos volátiles (AGV), CO_2 , CH_4 y calor, así como al crecimiento y proliferación de los propios microorganismos. Tanto los AGV's como los microorganismos son nutrientes o fuentes de nutrientes fácilmente disponibles para el animal hospedero. El metano producido (alrededor de 50 L/día en ovinos y 400 L/día en vacunos adultos) resulta

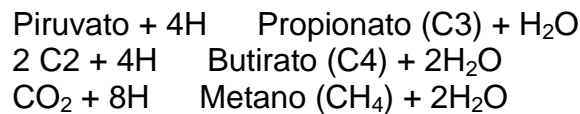
inherente tanto para la flora como para el huésped, siendo excretado en el eructo y en el aire expirado.³⁰

Moss *et al*³¹; señalan que la estequiometría de las principales rutas de fermentación se resumen así:

Reacciones productoras de H₂:



Reacciones que utilizan de H₂:



Van Kessel *et al*, señalan que «cuando sustancias reducidas son transferidas de bacterias ruminales fermentadoras de carbohidratos a bacterias metanógenas, el acetato se incrementa y generalmente el propionato disminuye. El acetato es preponderante bajo dichas condiciones pero no se considera precursor significativo de metano en el rumen»³².

Moss *et al*, señala que «el acetato y el butirato promueven la producción de metano, mientras que la formación de propionato puede ser considerada como una forma competitiva en el uso del H₂ en el rumen»³³.

³⁰ FEDERACIÓN ESPAÑOLA PARA EL DESARROLLO DE LA NUTRICIÓN ANIMAL, FEDNA, Contribución de los rumiantes a las emisiones de gases con efecto invernadero. 2008. 30 p.

³¹ MOSS AR, JOUANY JP, NEWBOLD J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. INRA EDP Sciences. Ann Zootech, 2000; 49: 231-253

³² VAN KESSELL JS, RUSSELL JB. The effect of pH on ruminal methanogenesis. FEMS Microbiology Ecology, 1996; 20: 205-210.

³³ MOSS A, R., *et al*. 2000. Op. cit., p. 15-16

Para Van Soest³⁴, otro aspecto importante a considerar es el incremento térmico negativo, producto del metabolismo del formato, el cual se relaciona con la producción de metano, debido a que el formato es un precursor de éste.

Según Ospina «la producción ruminal de metano está directamente relacionada con la concentración de H₂ disuelto; por lo tanto, en este punto de la metanogénesis existe una ventana a ser trabajada, de manera que se utilice este H₂ disuelto en procesos productivos, evitando la pérdida energética y el acceso a estos protones por parte de los microorganismos metanogénicos».³⁵

Van Kessell *et al* afirman que «La dependencia de pH de las bacterias metanógenas, aporta un factor importante para la predicción de la producción de metano. Dietas con forrajes de baja calidad no causan una significativa disminución en el pH ruminal y están asociadas a una alta producción de metano. Mientras que dietas con altos contenidos de alimentos concentrados, generalmente disminuyen la producción de metano, pero sólo si el consumo es lo suficientemente alto para causar una reducción en el pH ruminal»³⁶

Moss *et al* indican que «en dietas basadas en forrajes, pero con bajo pH se disminuye la metanogénesis, independiente de la formación de propionato»³⁷.

De forma similar Van Kessel y Russell, señalan tres aspectos:

- 1) las bacterias metanógenas son sensibles a pH bajos,
- 2) la disminución en la relación acetato:propionato dependiente del pH es posiblemente causada por una inhibición de la metanogénesis, y
- 3) la inhibición de la metanogénesis, es causada por la toxicidad de los ácidos de la fermentación que se produce a un pH bajo.

³⁴ VAN SOEST P, J. Nutritional ecology of the ruminant. Second edition. Cornell University Press, 1994; 476 p. Citado por CARMONA J. C., *et al*. 2005.

³⁵ OSPINA H. Op. cit., p. 3-4

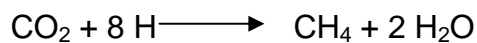
³⁶ VAN KESSELL, *et al*. 1996; 20: 205-210. Op. cit., p. 11

³⁷ MOSS AR., *et al*. 2000. Op. cit., p. 65

4.1.3 Población microbiana y metanogénesis. Van Soest³⁸ afirma que la flora microbiana responsable de los procesos fermentativos alcanza concentraciones muy elevadas ($10^{11} - 10^{12}$ /g de contenido digestivo), tanto en el rumen como en el intestino grueso. Por otra parte la población microbiana es extremadamente compleja constituyéndose por un gran número de especies y géneros de bacterias y protozoos que interactúan entre si y cuyo crecimiento se estimula o se inhibe en función del sustrato fermentado y de las condiciones del medio (principalmente acidez y velocidad de renovación).

Dentro de esta complejidad, se establecen grandes grupos de microorganismos en función del tipo de sustrato que fermentan (amilolíticos, celulolíticos). Un grupo de microorganismos anaerobios estrictos denominados «metanogénicos» está constituido por diferentes especies pertenecientes al subgrupo Archae

Estos son capaces de obtener energía reduciendo H_2 del gas del rumen y generando CH_4 como producto final:



Carmona *et al*, señalan que «Si bien existe gran cantidad de microorganismos en todo el sistema digestivo del rumiante, solo los del rumen mantienen una compleja simbiosis con el hospedero. Las bacterias, protozoos y hongos en el retículo-rumen son responsables de la digestión de nutrientes, pero igualmente de otros aspectos que afectan de forma positiva y eventualmente de forma negativa, al animal en sí y al medio ambiente».³⁹

De acuerdo con Kurihara *et al*, «el metano es producido por los microorganismos ruminales durante la fermentación anaeróbica de los carbohidratos solubles y estructurales, principalmente siendo estos últimos preponderantes en dietas basadas en forrajes»⁴⁰.

³⁸ VAN SOEST P., J. 2005. Op. cit., p. 17

³⁹ CARMONA J. C., *et al*. 2005. Op. cit., p. 50.

⁴⁰ KURIHARA M, MAGNER T, McCRABB H, McCRABB G. Methane production and energy partition of cattle in the tropics. British Journal of Nutrition, 1999; 81: 227-234.

Según Stewart⁴¹, Van Soest⁴² y Yokoyama *et al*⁴³, Las bacterias metanogénicas incluyen: *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanomicrobium mobile* y *Methanosarcinas*, la última especie, frecuente únicamente en ovejas con dietas basadas en melaza'

Según Yokoyama *et al*,⁴⁴ las bacterias metanogénicas tienen un rol especial en la población ruminal, por su papel en la regulación de la fermentación total al eliminar el H₂. La reducción de CO₂ con H₂ es el método primario por el que se produce el CH₄ en el rumen, sin embargo algunas bacterias metanogénicas como *Methanosarcina barkerii*, utilizan metanol, metilamina y acetato para producir CH₄. Al mantener baja la concentración de H₂, mediante la formación de CH₄, las bacterias metanógenas promueven el crecimiento de otras especies bacterianas y permiten una fermentación más eficaz. La eliminación de H₂ por las especies metanogénicas estimula a importantes especies productoras de H₂ tales como *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Selenomonas ruminantium* a producir más H₂ y así alterar su metabolismo hacia vías con mayores rendimientos de energía.

Por su parte Johnson y Johnson⁴⁵ indican que los protozoos ruminales también juegan un papel importante en la producción de metano, particularmente cuando el ganado es alimentado con dietas altas en granos. Las bacterias metanogénicas se han observado adheridas a especies protozoales, sugiriendo esto una posible transferencia interespecífica de H₂. La defaunación de animales recibiendo dietas con alto contenido de concentrados puede llegar a disminuir la producción de metano hasta aproximadamente la mitad. Sin embargo, la defaunación de animales recibiendo dietas altas en forraje no reducen significativamente las pérdidas de metano.

⁴¹ STEWART CS. The rumen bacteria. In: Jouany, JP. Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. INRA editions, Paris, France, 1991; 15-26

⁴² VAN SOEST P, J., 1994. Op. Cit., p.12

⁴³ YOKOYAMA MT, JOHNSON KA. Microbiología del rumen e intestino. En: Church DC. El rumiante: fisiología digestiva y nutrición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España, 1993; 137-156. Citados por: CARMONA J. C., *et al*. 2005.

⁴⁴. Ibíd.

⁴⁵ JOHNSON KA, JOHNSON DE. Op. cit., p. 11

4.1.4 Factores que determinan la producción de metano

4.1.4.1 Factores Ligados al animal

- Especie animal: de acuerdo con el Instituto Científico de Investigación Agronómica de España, INRA⁴⁶, La formación de CH₄ depende del tamaño y condiciones de la zona fermentativa, así como de la existencia de mecanismos que favorezcan la retención del alimento y que prolonguen por tanto el tiempo de actuación de los microorganismos. El volumen relativo del rumen —unido a su localización— favorece la existencia de una densa población microbiana (aprox. 2 kg de bacterias en un bovino adulto). Se estima que un 80% de la materia orgánica del alimento (incluyendo no solo la fracción fibrosa sino también gran parte de los componentes del contenido celular) es fermentada en el rumen.

El National Research Council NRC⁴⁷, en el ciego y colon de los rumiantes y también en otras especies animales, especialmente las herbívoras (caballos, conejos) y en menor grado las omnívoras (porcino), se produce también fermentación de nutrientes. Sin embargo, en estas zonas, los microorganismos solo pueden actuar sobre la fracción del alimento no digerida en el intestino delgado (constituyentes fibrosos principalmente). Además el tiempo de retención del residuo alimenticio es mucho más limitado que en el rumen, por lo que su importancia cuantitativa es inferior que la que ocurre en el rumen.

- Peso / Edad: El rumen y los procesos fermentativos se desarrollan con la edad, de forma que son mínimos en rumiantes lactantes, en los que la leche pasa directamente al abomaso sin fermentar y pasan a alcanzar después del destete una tasa proporcional a su tamaño.

Según Machmuller and Clark⁴⁸, en un análisis realizado en Nueva Zelanda (2006), sobre resultados de producción de metano en rumiantes en pastoreo, se establece

⁴⁶ INSTITUTO CIENTÍFICO DE INVESTIGACIÓN AGRONÓMICA, INRA. Alimentación de los rumiantes. Ed. Mundi Prensa, Madrid. 1981. 697 p.

⁴⁷ NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. National Academy Press. Washington D.C. 2001. 381 p.

⁴⁸ MACHMULLER, A. CLARK, H. First results of a meta-analysis of the methane emission data of New Zealand ruminants. International Congress Series. 2006. 54-57 p.

que la producción diaria de metano varía linealmente con el peso del animal expresado sobre el peso metabólico (PM = peso vivo^{0,75}):

$$\text{CH}_4 \text{ (g/d)} = 3,58 \text{ PM} - 35,8; R^2 = 0,83; n = 1025$$

- Nivel de producción: de acuerdo con Blaxter⁴⁹, un incremento del nivel de ingestión de alimento en animales altamente productivos implica un incremento de la velocidad de tránsito por el rumen y como consecuencia un menor tiempo de acción de los microorganismos, una menor digestión fermentativa y por ende, una menor formación de metano en términos relativos.

El mismo autor afirma que un incremento del nivel de alimentación desde el mantenimiento a dos veces este valor, implica un descenso de la producción relativa de CH₄ de 1-1,5 Kcal/100 Kcal de energía bruta ingerida.

4.1.4.2 Factores ligados a la alimentación de los rumiantes. Para Montenegro y Abarca⁵⁰, hay evidencias que muestran que la tasa de emisión de metano, por fermentación entérica, se relaciona con el alimento consumido. También se señala que entre los factores que influyen en su producción están las características físicas y químicas del alimento, las cuales afectan directamente el nivel de consumo y la frecuencia de alimentación, por tanto una subnutrición contribuye a incrementar los niveles de emisión de metano.

- Relación de concentrado a forraje en la ración: La alimentación de los rumiantes con raciones que contienen altas cantidades de concentrado en relación al forraje da lugar a una disminución del pH del contenido ruminal. Este efecto es consecuencia por un lado de la mayor velocidad de fermentación del concentrado y por otro de la disminución del poder tampón asociado al consumo de forraje de forma directa (capacidad buffer de las pectinas o la lignina) o indirectas (a través de la inducción de la rumia y de la entrada al rumen del tampón fosfato y bicarbonato contenido en la saliva).

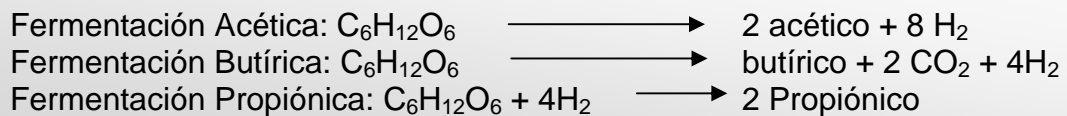
⁴⁹ BLAXTER, K, L. Metabolismo Energético de los Rumiantes. Ed. Acribia, Zaragoza. 1964. 314 p.

⁵⁰ MONTENEGRO J, ABARCA S. Citado por: CARMONA J. C., *et al.* 2005. Op. cit., p. 21-22

Moss *et al* afirman lo siguiente:

La acidificación del contenido ruminal supone cambios en la composición de la flora microbiana, que incluyen una disminución de la densidad de flora celulolítica y un aumento de flora amilolíticas. Como consecuencia, se reduce la digestión de la fibra y se altera el tipo de fermentación hacia la formación de una menor cantidad de ácido acético y mayor de ácido propiónico. El tipo de ácidos grasos producidos en la fermentación tienen un efecto directo sobre la cantidad de H₂ y CH₄ liberados, ya que como se observa en la figura 1, la formación de ácido acético es paralela a la de H₂ (4 moles de H₂/mol acético) mientras que la de ácido propiónico implica captura de H₂ (2 moles de H₂/mol de propiónico). De esta forma, las emisiones de CH₄ aumentan en paralelo a la relación [acético + butírico]/propiónico formado en el rumen.⁵¹

Figura 1. Balance de la fermentación de azúcares en el rumen según el tipo de ácido graso volátil producido



Fuente: Van Soest, 1994

- Tipo de forraje: según describen Kreuzer y Hindrichsen⁵², el uso de fuentes de fibra poco lignificadas (pulpa de remolacha, cascarilla de soya o forrajes tiernos de buena calidad) implican una mayor tasa de fermentación y de producción de metano que los forrajes maduros o subproductos altamente lignificados. Así, los resultados de la tabla 2 muestran una relación positiva entre la digestibilidad aparente del forraje y la cantidad relativa de CH₄ producida. De

⁵¹ MOSS AR, JOUANY JP, NEWBOLD J. 2000. Op. cit., p. 17

⁵² KREUZER, M., HINDRICHSEN, I.K. Methane mitigation in ruminants by dietary means: The role of their methane emission from manure. International congress series. 2006. 199 – 208 p.

hecho el uso de fuentes de fibra lignificadas se ha sugerido como una forma de reducir las emisiones de metano.

Tabla 2. Producción de metano al nivel alimenticio de mantenimiento (Kcal de CH₄/100 Kcal de alimento suministrado) en relación con la digestibilidad aparente del forraje y de su tamaño de molienda

Ración	Digestibilidad aparente de la energía (%)				Desviación típica de un ensayo aislado
	50	60	70	80	
Groseros	7,2	7,8	8,4	9,0	±4,07
Granulados	7,0	7,5	7,5	7,7	±0,53

Fuente: Blaxter, 1964

Como lo menciona el FEDNA⁵³, de los resultados de la tabla anteriormente presentada, puede también deducirse que la molienda y posterior granulación de los forrajes supone un descenso de las emisiones de metano, especialmente cuando los forrajes son de buena calidad. El procesado de los forrajes supone una disminución del tamaño de sus partículas y por ello una mayor facilidad de salida, un menor tiempo de permanencia en el rumen y una menor tasa de fermentación notablemente en los forrajes de mayor calidad potencialmente más fermentables. Por otra parte la molienda del forraje da lugar a un menor tiempo de rumia, una acidificación del contenido ruminal y una reducción de la relación acético/propiónico, lo que resulta en un efecto adicional sobre la disminución de la producción de metano.

Johnson y Johnson señalan que «la energía no aprovechada debido a la producción y eliminación de gas metano, se debe a muchos factores. Estos incluyen: cantidad y tipo de alimento, manipulación de la fermentación ruminal, adición de lípidos, tipo de carbohidrato en la dieta y procesamiento de los forrajes»⁵⁴. Convirtiéndose dichos factores en alternativas para la disminución de la metanogénesis.

⁵³ FEDNA. 2008. Op. cit., p. 12-13

⁵⁴ JOHNSON KA, JOHNSON DE. Op. cit., p. 31-32

4.1.4.3 Efecto de las dietas forrajeras tropicales en las emisiones de metano. Según Montenegro y Abarca⁵⁵, citados por Carmona *et al*—en ensayos realizados en Costa Rica— el Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) presenta una mayor eficiencia en la producción de leche que la Estrella Africana (*Cynodon nlenfuensis*), en gran parte por su menor producción de metano. Igualmente se concluye que para ambas pasturas la producción de metano es mayor en la medida que la edad de pastoreo se aumenta, debido al aumento en el material lignocelulósico. La emisión total anual de metano que se produce como consecuencia del consumo y del proceso digestivo del pasto, independiente de la especie forrajera, varía en función de los días de rebrote que presenta la pradera. La magnitud de la emisión es diferente según la especie ofrecida. Así, se ha determinado que cuando en la dieta de los bovinos en pastoreo se dispone de leguminosas, se mejoran los parámetros productivos concomitantes con una disminución en las producciones de metano.

Sin embargo, Anderson y Rasmussen⁵⁶, han señalado que como el H₂ y el formato, son sustratos para la metanogénesis por ende se puede pensar que los procesos de reducción de componentes nitrogenados pueden competir por esta reducción de sustratos, y desviarla de la biosíntesis de metano. Entonces, es factible pensar en el efecto positivo de las leguminosas forrajeras en la dieta de los rumiantes, por su aporte de nutrientes y por su efecto en la disminución de la metanogénesis.

Según De Ramus *et al*⁵⁷, la mejor estrategia para reducir la producción de metano, es a través de metodologías que mejoren la eficiencia de la energía de los alimentos. La opción de reducción de emisiones de metano consiste en la sustitución de tecnologías convencionales por alternativas relacionadas con una adecuada producción y mínimos efectos medioambientales. La implementación de prácticas de manejo en las pasturas que mejoren su calidad, incrementan la productividad y generalmente tienen un efecto significativo en la reducción de las emisiones de metano.

⁵⁵ MONTENEGRO J, ABARCA S. Op. cit., Citado por: CARMONA J. C., *et al*. 2005.

⁵⁶ ANDERSON RC and RASMUSSEN MA. Use of a novel nitrotoxinmetabolizing bacterium to reduce ruminal methane production. *Bioresource Technology*. 1998; 64: 89-95

⁵⁷ DE RAMUS, *et al*. Op. cit., p. 13

De acuerdo con Carmona *et al*⁵⁸, parece evidente el efecto positivo que tiene el balance de dietas con leguminosas y otras especies arbóreas, en la producción de metano en los sistemas silvopastoriles. Dichos sistemas que involucran leguminosas rastreras, arbustivas o arbóreas, y otros tipos de especies con potencial alimenticio, se han considerado una alternativa de amplia viabilidad con animales bajo pastoreo de gramíneas de baja calidad. Además, se consideran otros aspectos que redundan en una mejoría de las características edáficas y de bienestar en el animal.

4.1.4.4 Especies arbóreas con potencial forrajero utilizables en sistemas silvopastoriles y en la generación de servicios ambientales. De acuerdo con Botero y Ruso⁵⁹ 2005, la labor desarrollada en la última década por centros de investigación tales como CIPAV, La Universidad de Vietnam, UNELLEZ, CATIE, ICRAF y CIAT en el área de la evaluación de forrajes de origen arbustivo y arbóreo ha alcanzado considerable desarrollo y ha dado luz a la posibilidad de utilización de muchas especies que anteriormente no habían sido exploradas. Además, con la creación, en 1996, de la Red Tecnológica Internacional de Árboles Forrajeros, cuyo objetivo general fue proveer una estructura de colaboración y comunicación entre grupos de científicos y de extensionistas involucrados en la investigación y desarrollo del uso de árboles forrajeros en los sistemas de producción animal, se promovió el intercambio de información entre investigadores de diferentes partes del mundo, a través de un foro abierto que permitió compartir ideas, por medio de internet.

De acuerdo con Preston y Leng⁶⁰ 1989, esta tendencia de utilizar forrajes de origen arbustivo y arbóreo, está asociada con los incrementos mundiales de los precios de los granos de cereales y oleaginosas, realidad que causa mayores costos de producción animal y preocupación internacional por el uso de recursos que deben ser utilizados en la alimentación humana, como lo visualiza continuamente la FAO en su página web sobre seguridad alimentaria. De manera

⁵⁸ CARMONA J. C., *et al.* 2005. Op. cit., p. 17

⁵⁹ BOTERO, R. Y R.O. RUSSO. 2005. El componente arbóreo como recurso forrajero en los sistemas silvopastoriles. Escuela de Agricultura de la Región Tropical Húmeda, EARTH, San José, Costa Rica. [En línea]. [Consultado agosto 30 de 2011]. Disponible en internet: http://www.produccionbovina.com/produccion_y_manejo_pasturas/manejo%20silvopastoril/42-componente_arboreo.pdf.

⁶⁰ PRESTON, T.R. Y R.A. LENG. 1989. Ajustando los sistemas de producción pecuaria a los recursos disponibles: aspectos básicos y aplicados del nuevo enfoque sobre la nutrición de rumiantes en el trópico. Condit. Cali, Colombia. 312 p.

que el uso del componente arbóreo como recurso forrajero puede considerarse como una estrategia de reemplazo tendiente a mantener los sistemas pecuarios productivos en un marco de sostenibilidad.

El mismo autor afirma que el componente arbóreo, además de mejorar las condiciones físicas del suelo, bombear el agua y nutrimentos de estratos sub-superficiales, lo que contribuye a la reducción de la eutrofización de las aguas subterráneas, tiene también un aprovechamiento forrajero, brindando recursos alimenticios de alta calidad, que no compiten con la alimentación humana y poseen un alto índice de eficiencia de uso de la radiación solar, lo que se constituye en una estrategia altamente satisfactoria para afrontar los desafíos actuales de los sistemas de producción animal tropical.

Según Gómez *et al*⁶¹, 1995, las especies arbóreas con potencial forrajero no forman un grupo específico en términos de su clasificación botánica. Incluyen un número muy elevado de especies leñosas perennes que tienen potencial forrajero, ya sea por su follaje o por sus frutos. Aunque su uso en América Latina ha cobrado importancia en tiempos recientes, su uso en otros continentes ya era conocido. Wickens⁶² 1980 estimó que al menos un 75% de las 7.000 a 10.000 especies arbóreas nativas en África tropical eran usadas como forraje.

De acuerdo con Preston y Leng⁶³, 1989 el follaje de árboles con uso forrajero se caracteriza por tener un alto contenido de proteína cruda (hasta 35%), el doble o aún más del de las gramíneas tropicales y además contienen fibra larga, nitrógeno no proteico (NNP), proteína y grasa. Sin embargo, su digestibilidad es relativamente baja (entre 50-60%) comparada con los forrajes herbáceos. Cabe mencionar que la fibra larga, el NNP y una cantidad variable de la proteína, consumidos en el forraje arbóreo, son fermentados y utilizados como nutrimentos por la flora ruminal. Una parte de la proteína puede estar ligada a compuestos antinutricionales, llamados taninos y fenoles condensados, que le permiten escapar, con la grasa, a la fermentación ruminal, por lo cual su forraje puede ser

⁶¹ GÓMEZ, M.E., L. RODRÍGUEZ, E. MURGUEITIO, C.I. RÍOS, M. ROSALES, C.H. MOLINA, E. MOLINA Y J.P. MOLINA. 1995. Árboles y arbustos forrajeros utilizados en alimentación animal como fuente proteica: Mataratón (*Gliricidia sepium*), Nacedero (*Trichantera gigantea*), Pízamo (*Erythrina fusca*) y Botón de oro (*Tithonia diversifolia*). CIPAV, Cali, Colombia. 129 p.

⁶² WICKENS, G.E. 1980. Alternative uses of browse species. *In* Browse in Africa : the current state of knowledge. Edited by H.N. Le Houérou. ILCA, Addis Ababa . pp. 155-182.

⁶³ PRESTON, T.R. Y R.A. LENG. 1989. Op. Cit., p 218-221.

fuerza importante de proteína y de energía sobrepasantes, siempre que se logre un balance apropiado de nutrimentos en el ecosistema ruminal. Una cantidad variable de la proteína ligada a compuestos antinutricionales puede sobrepasar el aparato digestivo y salir inalterada en las heces (indigerible). Además, según afirma Botero y Russo 1997a⁶⁴; 1997b⁶⁵ ciertos compuestos antinutricionales, presentes en el forraje de algunas especies, pueden ser tóxicos para la flora (bacterias y hongos) o para la fauna (protozoarios) ruminales lo que tiene influencia benéfica sobre la disminución de emisiones de gases con efecto invernadero como el CH₄ y el CO₂.

Los mismos autores señalan que las especies arbustivas y arbóreas lignifican principalmente en los tallos y no tanto en las hojas, como si ocurre en la mayoría de las gramíneas tropicales utilizadas para el pastoreo. De allí la mayor estabilidad en la calidad nutricional del follaje de las especies leñosas a través del tiempo

Existe un número considerable de especies forrajeras arbóreas nativas e introducidas adaptadas a un amplio rango de zonas agroecológicas. En su mayoría son especies perennes, con excepción de varios ecotipos de guandul (*Cajanus cajan*), *Codariocalyx gyroides* y *Sesbania sesban* que se comportan como semi-perennes en cuyas familias y especies caben numerosas investigaciones con diversos fines a nivel de producción animal.

4.2 METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PRODUCCIÓN Y EMISIONES DE METANO

Según Carmona *et al.*,⁶⁶ para desarrollar estrategias que mitiguen las emisiones de metano en la ganadería, debe ser posible cuantificar estas emisiones bajo un amplio rango de circunstancias. Como lo describen Johnson y Johnson,⁶⁷ el metano puede ser medido usando espectroscopía infrarroja, cromatografía de gas,

⁶⁴BOTERO, R. y R.O. RUSSO. 1997a. Utilización de árboles y arbustos fijadores de nitrógeno en sistemas sostenibles de producción animal en suelos ácidos tropicales. *In* III Seminario Manejo y Utilización de Pastos y Forrajes en Sistemas de Producción Animal. R. Tejos, C. Zambrano, M. Camargo L.E. Mancilla W. García (eds.). UNELLEZ, Barinas, 20-22 de febrero de 1997. pp. 49-63.

⁶⁵ BOTERO, R. Y R.O. RUSSO. 1997b. Árboles y arbustos en producción animal en suelos ácidos del trópico. Carta Ganadera (Colombia) septiembre 1997, p. 43-47.

⁶⁶ CARMONA J. C., *et al.* 2005. Op. cit., p. 48

⁶⁷ JOHNSON KA, JOHNSON DE. Op. cit., p. 20

espectroscopía de masa y técnicas de diodo láser. Las mediciones de metano son difíciles de realizar sin cámaras respiratorias; una alternativa es estimar el metano a través de cálculos.

Existen diversas opciones para medir las emisiones de metano *In vivo*. El muestreo individual o a nivel grupal puede ser efectuado utilizando técnicas con cámaras cerradas o métodos con trazadores.

4.2.1 Técnicas de medición

4.2.1.1 Técnicas cerradas. Johnson y Johnson⁶⁸ afirman que las técnicas calorimétricas de respiración tales como las cámaras cerradas, cajas en la cabeza, o capuchas ventiladas y máscaras faciales han sido usadas con efectividad para la determinación de las emisiones de metano. Estas emisiones son determinadas por la medición del flujo total de aire por el sistema y la diferencia en la concentración entre el aire inspirado y espirado. En las cámaras, la mayor ventaja radica en las mediciones de metano tanto proveniente de la fermentación ruminal como de la fermentación del tracto posterior. Las desventajas de esta técnica involucra: los costos de construcción y de mantenimiento, la restricción de movimiento de los animales y la alta mano de obra.

Por consiguiente, de acuerdo con McCaughey *et al*⁶⁹ y Kinsman *et al*⁷⁰, la mayoría del ganado se encuentra bajo pastoreo de 5 a 12 meses del año, dependiendo de la localización geográfica, lo que implica amplias diferencias de comportamiento alimenticio y cinética ruminal que pueden afectar el consumo voluntario y la tasa de pasaje, difiriendo así, de lo observado en los sistemas cerrados tipo cámaras metabólicas.

4.2.1.2 Técnicas con trazadores. Las técnicas con trazadores isótopos y no isótopos son útiles. Los métodos con isótopos involucran el uso de [3H-] metano o

⁶⁸ Ibid.

⁶⁹ McCaughey W, WITTENBERG K, CORRIGAN D. Methane production by steers on pasture. *Can J An Sc*, 1997; 76 (3): 519-524.

⁷⁰ KINSMAN R, SAUER FD, JACKSON HA, WOLYNETZ, MS. Methane and carbon dioxide emissions from cows in full lactation monitored over a six-month period. *J Dairy Sci*, 1995; 78 (12): 2760-2766

[14C-] metano y animales canulados a rumen. La mayor limitación con trazadores isótopos es la dificultad en la preparación de la solución por la baja solubilidad del metano. Las técnicas con trazadores no isótopos también son útiles en la medición de producción de este gas. Un ejemplo de estas técnicas es el exafluorosulfuro (SF6), un gas trazador inerte colocado en el rumen. Todas estas técnicas tienen la ventaja que no limitan al animal en su comportamiento normal en pastoreo. Respecto a esta técnica McCaughey *et al*⁷¹ y DeRamus *et al*⁷², reportan que puede determinar del 93-98% del total de metano producido, comparado con las cámaras de respiración. DeRamus *et al*⁷³, señalan que esta técnica es sencilla, en la cual muestras de gas eructado son continuamente obtenidas a través de un tubo capilar, conectado a un colector localizado en el cuello del animal. Luego de la recolección de las muestras el colector es presurizado con nitrógeno (N₂) y con cromatografía de gases se determina el metano y el SF6.

4.2.1.3 Modelos de predicción de las emisiones de metano en rumiantes. Blaxter y Clapperton,⁷⁴ establecieron el primer modelo para la estimación de la producción de CH₄ en rumiantes (Y_m, Kcal CH₄/100Kcal EBi), a partir de datos obtenidos en ovinos adultos consumiendo forrajes y utilizando como predictores la digestibilidad de la energía de la ración (dE, %) y el nivel de alimentación (L, en múltiplos del nivel de mantenimiento, L = 1)

$$Y_m = 1,30 + 0,112 \text{ dE} + L (2,37 - 0,05 \text{ dE})$$

Conforme a lo estipulado por Johnson y Johnson⁷⁵ y Harper *et al*⁷⁶, la particularización de la ecuación muestra un efecto positivo de la dE del forraje y negativo del L sobre Y_m. No obstante, la extrapolación de estos resultados a dietas prácticas debe hacerse con precaución al no haberse incluido información procedente de raciones mixtas con concentrado en animales de alta producción.

⁷¹ McCAUGHEY W. *et al.* Op. cit., p. 11

⁷² DE RAMUS, *et al.* Op. cit., p. 25

⁷³ *Ibíd.*

⁷⁴ BLAXTER, K.L., CLAPPERTON, J.L. *Metabolismo energético de los rumiantes.* Ed. Acribia, Zaragoza. 1965. 314 p.

⁷⁵ JOHNSON KA, JOHNSON DE. Op. cit., p. 22

⁷⁶ HARPER, L.A., DENMEAD, O.T., FRENEY, J.R., BYERS, F.M. *Journal of Animal Science.* 1999. 77, 1392 – 1401.

Así, el rango de valores de Ym predichos por la ecuación en un intervalo de dE y L correspondientes a dietas practicas se encuentra en un 6 y 8%, cuando los valores obtenidos in vivo tienen una variación considerablemente superior (2 – 11%):

Una aproximación alternativa para estimar las emisiones de metano (CH₄, Mcal/d) en rumiantes propuesta por Moe y Tirrel (1979) a partir de 404 balances de energía en bovinos adultos, utilizando como predictores las ingestiones de nutrientes brutos o digestibles (Kg/d). Las ecuaciones fueron calculadas mediante una selección de variables (método stepwise), y fueron las siguientes:

a. Nutrientes brutos

$$\text{CH}_4 = 0,814 + 0,122 \times \text{CNF} + 0,415 \text{ HEL} + 0,633 \text{ CEL}; R^2 = 0,67$$

b. Nutrientes digestibles

$$\text{CH}_4 = 0,439 + 0,273 \times \text{CNF} + 0,512 \text{ HEL} + 1,393 \text{ CEL}; R^2 = 0,73$$

CFN = Carbohidratos no fibrosos

HEL = Hemicelulosa

CEL = Celulosa

Como lo describen Moe y Tyrrell⁷⁷, los resultados reflejan que los precursores para la producción de metano son principalmente los hidratos de carbono y que existen diferencias notables debidas al tipo de carbohidrato: 6,5; 11,5; 33,6 Kcal CH₄/100 Kcal de CNF, HEL y CEL digestibles, respectivamente. También indican que la precisión de la ecuación aumenta cuando se tienen en cuenta las diferencias de digestibilidad entre alimentos. Sin embargo, esta información no siempre está disponible ni es fácil de estimar.

⁷⁷ MOE, P.W., TYRRELL, H.F. Journal of Dairy Science. 1979. 62. 1583 – 1568.

4.2.1.4 Ecuaciones de predicción. Carmona *et al*⁷⁸ afirma, que un método desarrollado en 1960 por Wolin permite calcular las emisiones de metano a través de la distribución molar de los AGV. El balance fermentativo se ha usado para predecir la producción de metano por la conversión de carbohidratos de la dieta a AGV. Esta metodología asume que todo el exceso de H₂ es convertido en metano y no hay hidrógeno asociado con la síntesis de células microbiales y que de la fermentación de los sustratos no carbohidratados no se producen AGV.

Van Kessel y Russell indican que «cuando las células microbiales son incluidas en la estequiometría de la fermentación, los estimativos de la producción de metano disminuyen. Como es lógico esta técnica es criticada por muchos autores, pero es útil para propósitos comparativos»⁷⁹

En común acuerdo con Johnson y Johnson⁸⁰, las características del alimento también se usan para calcular la producción de metano. La ecuación de Blaxter y Claperton formulada en 1965, consideró inicialmente las características del alimento y es la base de la cual la mayoría de los estimativos de producción de metano se han derivado. Otra ecuación fue propuesta por Moe y Tyrrel en 1979, la cual también incorpora las características del alimento. Se deriva de mediciones realizadas en ganado con raciones diarias de alta calidad y su relación con residuos solubles, hemicelulosa y celulosa en la producción de metano.

4.2.1.5 Métodos fermentativos *In vitro*. Según la afirmación de Carmona *et al*⁸¹, los estudios en fermentación y digestión juegan un papel crucial en los estudios nutricionales y fisiológicos en rumiantes. Desde la década de los 50's muchos métodos han sido desarrollados para simular el ecosistema ruminal. Aunque los estudios *In vivo* han sido de gran importancia, las simulaciones *In vitro* del medio ambiente ruminal son frecuentemente efectivas y eficientes por su rapidez y bajo costo de operación.

⁷⁸ CARMONA J. C., *et al*. 2005. Op. cit., p. 14

⁷⁹ VAN KESSELL JS, RUSSELL JB. Op. cit., p. 112

⁸⁰ JOHNSON KA, JOHNSON DE. Op. cit., p. 23-24

⁸¹ CARMONA J. C., *et al*. 2005. Op. cit., p. 21

Kajikawa afirma que además, «porque se pueden definir factores específicos, que en condiciones *In vivo*, pueden ocultarse por una gran complejidad de factores»⁸².

Dentro de las técnicas más conocidas *In vitro* están la de Tilley y Terry implementada en 1963, o sus diversas modificaciones. Entre algunas desventajas de estos métodos se tienen: largo tiempo requerido para realizar un análisis, la gran cantidad de pasos y que la muestra no tiene flujo de recambio.

4.2.1.6 Rusitec (Rumen Artificial). Esta es una de las técnicas *In vitro*, que cuenta con modificaciones que permiten una mayor similitud a las características del ecosistema ruminal.

Kajikawa *et al*⁸³ indica que en la década de los 70's se desarrollaron dos de los sistemas de flujo continuo más implementados por los investigadores: el «sistema de cultivo de flujo continuo doble» originalmente desarrollado por Hoover *et al* y el «Rusitec» desarrollado por Czerkawsky y Breckenridge.

Esta última metodología, ha demostrado una adecuada correlación con los datos obtenidos *In vivo*, involucrando como ya se mencionó, mayor rapidez y menos costos, además de una mayor independencia de animales canulados.

Según Carmona *et al*,⁸⁴ diversos autores reportan el diseño del equipo y la metodología de su uso, pero no existe un manual unificado, debido a que su principal restricción está en que no es un equipo comercialmente disponible.

De acuerdo con Johnson y Johnson⁸⁵, en términos generales el Rusitec, es un equipo que normalmente consiste de ocho sistemas de flujo continuo donde

⁸² KAJIKAWA H, HAI J, TERADA F, SUGA T. Operation and characteristics of newly improved and marketable artificial rumen (Rusitec). In: Memoirs of National Institute of Livestock and Grassland Science. N° 2. Mar. 2003. Citados por CARMONA J. C., *et al*. 2005.

⁸³ *Ibíd.*

⁸⁴ CARMONA J. C., *et al*. 2005. *Op. cit.*, p. 23

⁸⁵ JOHNSON KA, JOHNSON DE. *Op. cit.*, p. 32

interactúan la fase líquida y sólida del rumen (obtenida del rumen de animales donadores), las muestras a analizar (confinadas en bolsas de nylon) y un sistema buferante o de saliva artificial que permite en el sistema un control del pH, a través de sus componentes tipo carbonatos y fosfatos. En cada sistema compuesto por vasos secuenciales —generalmente con una capacidad aproximada de un litro— se colocan más o menos 500 ml. de fluido ruminal con 200 ml. de saliva artificial y 100 ml. de agua, posteriormente agregando agua hasta un nivel total de un litro. Inicialmente, una porción sólida de contenido ruminal se adiciona (80 a 100 g/l) para garantizar una fuente de microorganismos que habitan en esta fracción.

Czerkawsky y Breckenridge⁸⁶, citados por Carmona *et al*, sugieren que un período de acople en la fermentación entre cuatro y seis días debe ser adecuado, aunque hasta 11 días se requieren en algunos casos cuando se evalúan dietas de baja calidad. Una semana de período de adaptación es probablemente suficiente para dietas de buena calidad.

En la descripción establecida por Abreu⁸⁷, dentro de muchas mediciones, se encuentra la determinación de producción de gases en el sistema. Producto de la fermentación se produce en un tiempo determinado; un volumen de gas que es almacenado de forma individual por fermentador en bolsas con película de fluoropolivinil. La producción de metano presente en el volumen total de cada bolsa, se determina por diferentes métodos, siendo la cromatografía de gases el más utilizado en este caso. Para obtener este efecto las bolsas se acoplan al sistema cromatográfico, en donde se determina el porcentaje de gas en la muestra y se valora la cantidad total teniendo en cuenta el volumen total de gas en la bolsa.

⁸⁶ CZERKAWSKI JW, BRECKENRIDGE G. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition*, 1977; 38: 371-384. Citados por Carmona *et al*. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. Vol. 18-1 2005.

⁸⁷ ABREU A, CARULLA JE, KREUZER M, LASCANO C, DÍAZ TE, CANO A, HESS, HD. Efecto del fruto, del pericarpio y del extracto semipurificado de saponinas de *Sapindus saponaria* sobre la fermentación ruminal y la metanogénesis *in vitro* en un sistema RUSITEC. *Rev Col Cienc Pec*. 2003; 16: 147-154

4.3 TÉCNICA *In vitro* DE PRODUCCIÓN DE GASES

Como afirma Álvarez, «las técnicas de producción de gas son de mucho interés en la valoración de los animales por su habilidad para evaluar las dinámicas de digestión y su potencial para simular los procesos de digestión en el rumen.»⁸⁸ La técnica de producción de gas *In vitro* caracteriza los alimentos por su cantidad digestible de carbohidratos y por la tasa a la cual estos nutrientes son liberados.

Getachew señala que «por lo tanto este sistema hace útil evaluar rutinariamente los forrajes porque produce resultados con alta precisión y repetición»⁸⁹. Recientemente, las técnicas de producción de gas, han sido de mucho interés y se ha incrementado su utilización gracias a la facilidad y utilidad de datos sobre la cinética de la digestión tanto de las fracciones solubles como las insolubles en dietas basadas en forrajes.

Para Álvarez «la técnica de producción de gas *In vitro* es utilizada para evaluar el valor nutricional de los alimentos y para obtener un mejor conocimiento de los procesos de fermentación que ocurren frecuentemente en el rumen, ya que la esencia de esta técnica es simular la fermentación de éste».⁹⁰

4.3.1. Desarrollo de la técnica de producción de gas. Según Bruni y Chilibroste⁹¹, la medición dentro de la producción de gas como una aproximación a la fermentación ruminal no es nueva, Mc Bee en 1953 describió un método manométrico para medir la producción de gas generado por una mezcla de bacterias ruminales, la cual posteriormente fue sufriendo diferentes modificaciones.

⁸⁸ ALVAREZ N, Diana M. Evaluación *In vitro* de leguminosas tropicales como fuente de proteína para rumiantes. Trabajo de grado Zootecnista. Palmira Valle del Cauca. Universidad Nacional de Colombia, 2000. 120 p.

⁸⁹ GETACHEW, G. *et al.* *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. En: Animal Feed Science and Technology. Vol. 72; 1998; p. 261–281.

⁹⁰ ALVAREZ N, Diana M. Op. Cit., p. 44

⁹¹ BRUNI, M. de los A., CHILIBROSTE, P. Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. Departamento de Producción Animal y Pasturas - EEMAC, Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Uruguay. 2001.

Menke y algunos de sus colaboradores⁹² (1988), en Alemania, describieron un sistema *In vitro* en el cual la producción de gas de un sustrato es usada para la predicción de la digestibilidad y el contenido de energía metabolizable. El método utiliza una jeringa en la cual se incubaba el sustrato en un medio bufferado e inóculo ruminal. La producción de gas es medida a diferentes intervalos de tiempos por la posición del embolo en la jeringa. Recientemente en diferentes países se ha trabajado en métodos para simplificar y computarizar la medición de gas.

Theodorou *et al*⁹³ (1994; 1995) reportaron perturbaciones en el crecimiento microbiano por no extraer el gas generado en los diferentes intervalos de tiempo, mientras que los investigadores de la Universidad de Cornell no.

El mismo autor⁹⁴ señala, que para la determinación de la producción de gas es necesario considerar todos los factores que afectan a los sistemas *in vitro* en general, ya que sus efectos alteran tanto la actividad microbiana en forma directa como al gas generado durante la fermentación.

4.3.2 Medición del volumen de gas. Para medir la producción de gas se han usado diferentes aproximaciones:

- 1) a presión atmosférica constante
- 2) a volumen fijo, y
- 3) una combinación de las anteriores mediante la medición del incremento de volumen necesario para causar un cambio definido de presión.

Según Hungate⁹⁵ 1955; y Beuvink *et al*⁹⁶ 1992, Los métodos manométricos iniciales y sus modificaciones son ejemplos de la primera aproximación, midiendo la cantidad de agua desplazada debido a la acumulación de gas.

⁹² MENKE K. H. and STEINGASS, H. 1988. Estimation of the energetics feed value obtained from chemical analysis and *In vitro* gas production using rumen fluid. Animal Research and development.

⁹³ THEODOROU, M.K., DAVIES, D.R., NIELSEN, B. B. LAWRENCE, M. I. G. and TRINCI, A.P.J., 1995. Determination of growth of anaerobic fungi on soluble and cellulose substrate using a pressure transducer. Journal of general microbiology. 141: 671-678.

⁹⁴ Ibid. p. 35 – 36

Otro ejemplo es el desarrollado en Alemania por Menke *et al*⁹⁷ 1979 y sus modificaciones, (Menke and Steingass⁹⁸ 1988; Blummel and Ørskov⁹⁹ 1993). En el cual la sensibilidad de la jeringa utilizada para la medición en estas es baja. Los métodos manométricos fueron superados por el desarrollo de transductores de presión a pequeña escala con los cuales es posible monitorear la producción de gas manualmente (Theodorou *et al*¹⁰⁰, 1994) o en forma totalmente automatizado (Beuvink *et al*¹⁰¹ 1992; Pell and Schofield¹⁰², 1993).

4.3.3 Medición de la presión de gas. Pell y Schofield (1993), Theodorou *et al* (1994), Davies *et al* (1995) y Cone *et al* (1996), citados por Posada y Noguera¹⁰³, afirman que la cinética de producción de gas puede medirse de una forma más precisa empleando transductores de presión.

Los transductores de presión ofrecen una vía sencilla y precisa de medir la producción de gas. La diferencia más importante en las variantes reportadas, radica en la evacuación o no del gas generado durante la fermentación entre los intervalos de medición.

⁹⁵ HUNGATE, R. E. FLETCHER, D.W., DOUGHERTY, R. W., and BARRENTINE, B.F. 1955. Microbial activity in the bovine rumen: its measurement and relation to bloat. *Applied Microbiology*. 1: p. 106-110.

⁹⁶ BEUVINK, J.M. W. and SPOELTRA, S.F. and HOGENDORP, R.J., 1992. An automated method for measuring time-course of gas production of feestuffs incubated with buffered rumen fluid. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 40:401-407.

⁹⁷ MENKE, K.H., RAAB, L., SALEWSKI, A., STEINGASS, H., FRITZ, D. and SCHNEIDER. 1979. Estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuff from the gas production when they are incubated with rumen liquor *In vitro*. *J. Agric. Science* 93:217- 222.

⁹⁸ MENKE K. H. and STEINGASS, H. 1988. *Op. cit.*, p. 34.

⁹⁹ BLÜMMEL, M.; and ØRSKOV E.R. 1993; Comparison of *In vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 40:109-119.

¹⁰⁰ THEODOROU M., WILLIAMS B., DHANOA M., Mc ALLAN A., France J. 1994 A simple gas production method using a pressure trasducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Scince and Tecnology*, (48):185-197

¹⁰¹ BEUVINK, J.M. W. 1992. *Op. cit.*, p. 23-35

¹⁰² PELL A. N. and SCHOFIELD P. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *In vitro*. *J. Dairy Sci.* 76:1063-1073

¹⁰³ POSADA, Sandra Lucia., NOGUERA, Ricardo. *Op. cit.*, p. 22-24

4.3.3.1 Los sistemas semiautomáticos. Posada y Noguera¹⁰⁴ reportan que, en el sistema británico de Theodorou *et al* (1994), los sustratos se incuban en frascos sellados causando la acumulación de los gases de la fermentación en el espacio superior y un ensamble de jeringa-transductor de presión, es usado para medir y liberar el gas acumulado hasta restaurar la presión atmosférica al interior del frasco.

Para Davies *et al*¹⁰⁵ 1995; y Cone *et al* 1996¹⁰⁶ las mediciones de presión acumuladas en el espacio superior, son usadas para generar estimados del volumen de gas, usando una función cuadrática derivada de mediciones simultáneas de presión y volumen. A diferencia de los sistemas completamente automáticos, que combinan cada botella con su propio transductor de presión, este utiliza un único transductor de presión para todos los frascos de fermentación.

De acuerdo con Menke *et al*¹⁰⁷ 1979, las principales ventajas del sistema son la alta capacidad, el bajo costo, su fácil mantenimiento y su mayor seguridad, ya que en comparación con la técnica de la jeringa se reducen los errores de operación y medición.

Por el hecho de que las mediciones pueden ser tomadas en cortos intervalos, el tiempo de colonización es mejor descrito. Sin embargo, la demanda de frecuentes lecturas durante la fermentación inicial y el hecho de que las mediciones tienen que ser manualmente ingresadas a las hojas de cálculo limitan la capacidad y la seguridad del sistema

4.3.3.2 Los sistemas automáticos. Posada y Noguera afirman que, «el dispositivo automático más tempranamente reportado fue desarrollado por Beuvink *et al* (1992). Este sistema está basado sobre el peso del fluido desplazado por el gas

¹⁰⁴ *Ibid.*

¹⁰⁵ DAVIES D.R., THEODOROU M.K., BAUGHAN J., BROOKS A.E. and NEWBOLD J.R. 1995. An automated pressure evaluation system (APES) for determining the fermentation characteristics of ruminant feeds. *Annales de Zootechnie* 44 (Suppl 1), 36.

¹⁰⁶ CONE, J. W., GELDER, A. H., VAN VISSCHER, G. J. W. 1996. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time released gas production apparatus. *Animal Feed Science and Technology* 61: 113-128

¹⁰⁷ MENKE *et al.* 1979. *Op. cit.*, p. 23

de fermentación de botellas individuales. El cambio en el peso es registrado y un cálculo para convertir el peso a volumen de gas es realizado»¹⁰⁸.

Los restantes sistemas automáticos difieren en si los frascos permanecen cerrados y la presión acumulada es registrada (Pell y Schofield¹⁰⁹, 1993) o si los frascos son desahogados de acuerdo a un umbral de presión dado o intervalo de tiempo (Davies *et al*¹¹⁰ 1995; Cone *et al*¹¹¹ 1996). Por el hecho de que cada válvula que se abre representa la liberación de una cantidad conocida de gas, el total de gas producido puede ser determinado por la contabilización de las válvulas abiertas (Davies *et al*¹¹² 1995).

Una ventaja de los sistemas automáticos es la reducción de la labor, especialmente las primeras 36 horas de incubación donde, debido a la rápida fermentación, frecuentes lecturas son requeridas en los procedimientos manuales (Pell *et al*¹¹³ 1997). No obstante, el alto costo inicial, la complejidad y los problemas de mantenimiento, hacen de ellos sistemas inapropiados para muchos laboratorios, especialmente en países en desarrollo (Mauricio *et al*¹¹⁴ 1999).

4.3.4 Limitaciones de la técnica de producción de gas. Son varios los factores que afectan la medida de la producción de gas entre los que se pueden destacar:

- La solubilidad de los gases en los líquidos
- Tipo de fermentación
- Producción de gas indirecta a partir del buffer del medio de cultivo

¹⁰⁸ Ibid., p. 24

¹⁰⁹ PELL Y SHOFIELD 1993. Op. cit., p. 33-35

¹¹⁰ DAVIES *et al.* 1995. Op. cit., p. 45

¹¹¹ CONE *et al.* 1996. Op. cit., p. 345-354

¹¹² DAVIES *et al.* 1995. Óp. cit., p. 234

¹¹³ PELL A, N., DOANE P, H., SCHOFIELD P. *In vitro* digestibility and gas production.: Simpósio sobre Tópicos Especiais em Zootecnia, Lavras, MG; 1997. p. 109 –132.

¹¹⁴ MAURICIO R, M., MOULD F, L., DHANOA M, S., OWEN E., CHANNA K, S., *et al.* A semi-automated *In vitro* gas production technique for ruminants feedstuff evaluation. Anim Feed Sci Technol 1999; 79: p. 321-330

- Contenido de N de la muestra
- Tamaño de partícula
- Procesamiento de la muestra

Las reacciones más importantes que se dan en la fermentación de los carbohidratos, fueron resumidas por Wolin¹¹⁵ (1960) y Hungate¹¹⁶ (1966), de las que se puede concluir que la cantidad de gas producido depende de la cantidad de hexosas fermentadas, y la proporción molar de los diferentes AGV producidos.

Para Bruni y Chilibroste, «los cambios en el patrón de fermentación que incrementen la proporción de ácido butírico y acético y disminuya la proporción de propiónico, pueden resultar en un incremento en el volumen de gas».¹¹⁷

Posada y Noguera¹¹⁸ plantean que una de las limitaciones de la Técnica de producción de gas, es que el cambio en el perfil de AGV puede causar alteraciones en la relación entre la desaparición de sustrato y la producción de gas, debido a que la producción de CO₂ durante la fermentación de un sustrato proviene de diversas fuentes. También es una limitación la falta de uniformidad en las metodologías, lo que hace difícil comparar resultados entre grupos de investigación.

Además, como otros métodos de bioensayo, requieren animales fistulados en el rumen para la obtención del inóculo y la fistulación no solamente incrementa el número de problemas prácticos, como son la facilidad quirúrgica, el constante cuidado para evitar infecciones, particularmente en los trópicos, el costo asociado con el largo término de mantenimiento de esos animales, sino que se trata de un procedimiento invasivo, el cual está en desuso por consideraciones éticas.

¹¹⁵ WOLIN, M. J. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *Journal of Dairy Science* 43: 1452-1459.

¹¹⁶ HUNGATE 1966. *The rumen and its microbes*. Academic Press, New York.

¹¹⁷ BRUNI, M. de los A., CHILIBROSTE, P. Op. cit., p. 3-5

¹¹⁸ POSADA, Sandra Lucia., NOGUERA, Ricardo. Op. Cit., p. 11-15

De acuerdo con Mauricio *et al*¹¹⁹, existe la necesidad de identificar un inóculo alternativo al licor ruminal como fuente de microorganismos y una alternativa consiste en el uso de las heces.

4.3.5 Aplicaciones de la Técnica de Producción de Gas. Chamberlain¹²⁰, utiliza la técnica de producción de gas como un indicador de la actividad microbiana, debido a que ésta es posible gracias a la energía disponible en rumen contenida en los alimentos. En este sentido la información que se puede obtener a partir de los datos de producción de gas resulta de gran utilidad dado el potencial de conocimiento del ecosistema ruminal. Una aproximación alternativa y poco explorada, constituye el empleo de sistemas de producción de gas *In vitro* — como indicadores del estatus interno del rumen— reflejando por ejemplo cambios en el nivel de llenado y potencial fermentativo producto de diferentes estrategias de alimentación, los que podrían ser empleados para describir cambios en la capacidad digestiva *In vivo* o dilucidar limitaciones digestivas de un sustrato.

4.3.5.1 Predicción de la digestibilidad. Nsahlai *et al*¹²¹, han demostrado que la producción de gas está relacionada con la desaparición de la FDN y al respecto Pell *et al*¹²² (1997), encontraron que la relación entre ambos conceptos es lineal, con una pendiente marcadamente constante. Igualmente se ha encontrado una alta correlación entre la producción de gas *In vitro* y la disponibilidad del almidón en los granos de cereales. Opatpatanakit *et al*¹²³ 1979 encontraron que la producción de gas acumulada en 24 horas estuvo bien correlacionada con la digestibilidad de la MO determinada *in vivo*.

¹¹⁹ MAURICIO *et al.* 1999. Op. cit. p. 321-330

¹²⁰ CHAMBERLAIN, A.T. The gas production capacity of purified chemicals and feedstuffs when incubated *In vitro* with rumen microbes as a posible indicator of energy availability in the rumen. In: British Society of Animal Production. Jubilee Winter Meeting. 1994. N° 91.

¹²¹ NSAH LAI, I. V., UMUNNA, N. N., NEGASSA, D. The effect of multi-purpose tree digesta on *In vitro* gas production from napier grass or neutral-detergent fibre. Journal of the Science of Food and Agriculture. 1995. 519-528.

¹²² PELL *et al.* 1997. Op. cit. p. 109 –132

¹²³ OPATPATANAKIT, Y., KELLAWAY, R. C., LEAN, I. J., ANNISON, G., KIRBY, A., Microbial fermentation of cereal grains *In vitro*. Australian. Journal of Agricultural Research. 1994. 1247-1263.

Finalmente, Sileshi *et al*¹²⁴ (1996) y López *et al*¹²⁵ (1998) citados por Posada y Noguera¹²⁶, han reportado significativas correlaciones entre la tasa fraccional de desaparición de la MS *in situ* y la tasa fraccional de producción de gas.

4.3.5.2 Estudio de los constituyentes del alimento. Posada y Noguera, afirman que, «la técnica de producción de gas puede ser también usada para determinar la importancia de las diferentes fracciones alimenticias (monosacáridos, pectina, almidón, celulosa y hemicelulosa) para proveer energía a los microorganismos y para determinar que componentes inhiben la actividad microbiana»¹²⁷.

De acuerdo con Williams¹²⁸ La discrepancia entre los valores estimados de fermentabilidad de los forrajes empleando técnicas *In situ* e *In vitro* se presenta por la más baja fermentación de la fibra en el sistema *In vitro*.

Algunas razones que explican esta discrepancia, corresponden al hecho que algunas plantas tienen factores antinutricionales, los cuales son liberados durante la fermentación y se acumulan en el medio de incubación alcanzando niveles inhibitorios para los microorganismos, en tanto que en la técnica de la bolsa de nylon la toxicidad para los microorganismos o el enlace a sus enzimas es diluido.

Adicionalmente según Nherera *et al*¹²⁹ 1999, los métodos basados en determinaciones gravimétricas permiten la solubilización de los factores

¹²⁴ SILESHI Z, OWEN E, DHANOA M S, THEODOROU M K. Prediction of in situ rumen dry matter disappearance of Ethiopian forages from an *In vitro* gas production technique using a pressure transducer, chemical analyses or *In vitro* digestibility. *Animal Feed Science and Technology*. 1996. 61: 73-87.

¹²⁵ LÓPEZ S, CARRO M D, GONZÁLEZ J S y OVEJERO F J. Comparison of different *In vitro* and in situ methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*. 1998. 73: 99-113.

¹²⁶ POSADA, Sandra Lucia., NOGUERA, Ricardo. Op. cit., p. 12-15

¹²⁷ *Ibid.*

¹²⁸ WILLIAMS, 2000. En: Técnica *In Vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. [online]. Citado por: POSADA S. L., y NOGUERA R.R. En: *Livestock Research for Rural Development*. 2005. [Fecha de consulta Marzo 25 de 2010]. Disponible en internet: <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd17/4/posa17036.htm>.

antinutricionales, por lo que ellos son medidos como MS digestible cuando realmente no hicieron ninguna contribución de energía al sistema. Contrariamente, en la técnica de gas, el efecto de estos principios sobre la fermentación ruminal es reflejada precisamente en la menor producción de gas.

4.3.5.3 Determinación de la calidad del alimento. Para Williams¹³⁰ 2000, la técnica de producción de gas permite detectar diferencias entre los sustratos generadas por su madurez, condiciones de crecimiento, especie o cultivar y métodos de preservación. Igualmente ha sido usada para determinar diferencias en la fermentabilidad de los residuos de cosecha sometidos a diversos tratamientos químicos o físicos.

4.3.5.4 Estudio de la cinética de fermentación. Según Getachew *et al*¹³¹ 1998 la cinética de producción de gas depende de las proporciones de partículas solubles, insolubles pero degradables, y no degradables del alimento.

Williams 2000 afirma que La sincronización entre la energía y el nitrógeno suplementados en el rumen, es una aproximación para mejorar la eficiencia de la fermentación ruminal. Para aplicar este principio en formulación de alimentos, se necesitan datos sobre las tasas de degradación de las proteínas y de fermentación de los carbohidratos. Las técnicas de producción acumulativa de gas pueden ser usadas para generar esta información. La producción de gas podría también ser potencialmente usada para comparar la cinética de fermentación desde el rumen o el intestino grueso de diferentes especies y/o del resultado de diferentes dietas.¹³²

4.3.5.5 Predicción del consumo. Ørskov *et al*¹³³ 1980 demostraron que el consumo de forrajes fue mejor correlacionado con sus características de

¹²⁹ NHERERA *et al* 1999. En: Técnica *In Vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. [online]. Citado por: POSADA S. L., y NOGUERA R.R. En: Livestock Research for Rural Development. 2005. [Fecha de consulta Marzo 25 de 2010]. Disponible en internet: <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd17/4/posa17036.htm>

¹³⁰ WILLIAMS 2000. Op. cit., p. 23-25

¹³¹ GETACHEW *et al*. 1998. Op. cit., p. 234-236

¹³² WILLIAMS 2000. Op. cit., p. 35-37

¹³³ ØRSKOV E., R., *et al*. Uso de la técnica de la bolsa de nylon para la evaluación de alimentos. En: Producción Animal Tropical. Vol. 12 - 1980. p. 213-223.

degradabilidad ruminal que con la digestibilidad en el tracto digestivo total. La técnica de producción de gas ha sido usada como una medida de la degradación ruminal de los alimentos y como un indicador del consumo de MS digestible. De hecho, según afirma López *et al*¹³⁴ 1998 la tasa fraccional de degradación ha sido un medio para predecir el consumo voluntario de forrajes por los rumiantes. No obstante, y según manifiesta Pell *et al*¹³⁵ 1997 en los intentos que se han realizado para relacionar las tasas de digestión *In vitro* con el consumo de MS, las correlaciones han sido bajas, porque las variables claramente importantes en regular el consumo tales como el estado fisiológico, el nivel de producción y las condiciones ambientales no son tenidas en cuenta.

Por su parte Noguera, afirma que «la producción de gas desde la FDN está mejor correlacionada con el consumo voluntario que los valores obtenidos desde la incubación del forraje entero porque el consumo de pared celular genera distensión ruminal»¹³⁶.

¹³⁴ LÓPEZ S., *et al*. Comparison of different *In Vitro* and *In Situ* methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 1998. p. 99-113.

¹³⁵ PELL *et al*. 1997. *Op. cit.* p. 109 –132

¹³⁶ NOGUERA J.R. Estudo químico, “*In situ*”, “*In vitro*” e microscópico da parede celular de cinco genótipos de sorgo colhidos em três épocas de corte. *Ph. D. Thesis*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2002. 148p.

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 LOCALIZACIÓN

La fase de campo se llevó a cabo en la zona de influencia de la granja lechera Chimangual, propiedad de la Universidad de Nariño, correspondiente al distrito lechero de Guachucal¹³⁷ dentro de la cuenca lechera del departamento, ubicada en el corregimiento de Panamal, vereda la Verbena, municipio de Sapuyes, a 18 kilómetros de la ciudad de Túquerres, sobre el kilómetro 80 en la vía que conduce a Tumaco, esta se encuentra a una altura de 3150 msnm, temperatura promedio de 9°C, humedad relativa del 85% y precipitación de 1250 mm anuales, para una caracterización de zona de vida; según Holdridge¹³⁸ de bosque húmedo montano (bh-M). Con respecto a las características del suelo, es ácido, franco arenoso y de mediana fertilidad. El relieve es 90% plano y 10% presenta algún grado de inclinación.

La zona de influencia comprendió un área de la región andina entre la cordillera centro oriental del departamento de Nariño, la cual abarcó parte de los municipios de Sapuyes, Túquerres y del suroccidente de Pasto, cuyos territorios se hallaron dentro de los 2500 y 3200 msnm y en los que predominan temperaturas que oscilan entre los 8 y 12°C, y precipitaciones medias anuales de 800 a 1500 mm. Estas regiones según la FAO¹³⁹ y Holdridge¹⁴⁰ corresponden a las zonas de vida bosque húmedo montano (bh-M) y Páramo sub-andino (p-SA), caracterizadas por la presencia de pastos naturales y bosque secundario, cuyas particularidades han permitido un amplio desarrollo del sector lechero en estos lugares.

De estos lugares se recogieron las muestras de los recursos forrajeros empleados en la alimentación de los bovinos lecheros según se describe en la tabla 3.

¹³⁷ COOPERATIVA DE PRODUCTORES LÁCTEOS DE NARIÑO, Colácteos. Criterio administrativo de clasificación. 2010.

¹³⁸ HOLDRIDGE L., R. Sistema de clasificación de las Zonas de Vida Natural del Mundo. En: Recopilación de documentos. 1998. p.145.

¹³⁹ FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, FAO. Evaluación de los recursos forestales mundiales. Informe principal. [En línea]. 2000 [consultado en 05 de Febrero de 2010]. Disponible en internet: <www.fao.org/docrep/005/y1997s/y1997s00.htm>

¹⁴⁰ HOLDRIDGE L.R. Op. Cit., p. 145

El trabajo de laboratorio correspondiente a la incubación de las muestras recolectadas mediante la técnica *In vitro* de producción de gases, se desarrolló en los Laboratorios Especializados de la Universidad de Nariño, Ciudadela Universitaria Torobajo, ubicados dentro de las coordenadas 1° 14' 3" de Latitud Norte y 77° 17' 7" de Longitud Oeste, a una altura de 2488 msnm., con una temperatura promedio de 10°C¹⁴¹.

Tabla 3. Lugares de muestreo de las especies evaluadas

Espece	Zona de muestreo
<i>Mezcla Lolium sp. Holcus lannatus, Trifolium repens, Dactylis glomerata, Rumex sp., Taraxacum officinale, y Raphanus sativus L.</i>	Granja Chimangual, vereda la Verbena, municipio Sapuyes.
<i>Mezcla Lolium sp.</i>	
<i>Medicago sativa</i>	
<i>Phalaris arundinacea</i>	
<i>Acacia decurrens</i>	
<i>Raphanus sativus L.</i>	
<i>Sambucus nigra</i>	
<i>Otholobium munyense</i>	
<i>Baccharis latifolia H.B.K.</i>	
<i>Abutilon striatum van</i>	
<i>Ambrosia arborescens Hill</i>	
<i>Beta vulgaris follaje y fruto</i>	Vereda Cruz de Amarillo, Finca Gualcalá, Municipio Pasto.

5.2 FISIOGRAFÍA

La región andina, es el rasgo más sobresaliente del departamento de Nariño, al penetrar la cordillera de los Andes forma el nudo de Los Pastos, de donde se desprenden dos ramales: la cordillera Occidental, y la cordillera Centro – Oriental, la que presenta el altiplano de Túquerres - Ipiales, el Valle de Atriz y los volcanes Galeras (4.276 m) y Doña Juana (4.250 m).

¹⁴¹ UNIVERSIDAD DE NARIÑO, Departamento de Geografía, 2005.

Esta zona se halla constituida de rocas sedimentarias muy antiguas del Cretácico, que han sido fuertemente deformadas y plegadas; se caracteriza, al sur, por un dominio de relieves estructurales y sub-estructurales (mesas, cuevas y cerrones) y relieves derivados de las estructuras anteriores (cañones angostos y profundos, abruptos y cornisas) por efecto de la fuerte erosión hídrica. Las superficies de estas estructuras forman colinas irregulares, con cimas predominantemente redondas estrechas y localmente agudas, las vertientes son de fuerte pendiente y desnivel moderado y al pie de las colinas se forman extensos valles entre planos y ondulados que son terrenos apropiados para el desarrollo de la actividad ganadera principalmente¹⁴².

Según el Instituto Geográfico Agustín Codazzi IGAC:

Los suelos del trópico alto de Nariño, son moderadamente profundos, texturas frugalmente gruesas y medias, drenajes imperfectos, fuertemente ácidos, baja a moderada fertilidad, alta materia orgánica, buena capacidad de laboreo y mecanización. En esta región las principales limitantes son las frecuentes heladas; en algunos suelos la mediana o alta saturación de aluminio, baja fertilidad y poca retención de humedad. Estas condiciones conllevan a que su dedicación sea en pastos para ganadería intensiva, aunque los niveles de explotación dependen de las particularidades de cada sector¹⁴³.

5.3 METODOLOGÍA

5.3.1 Tipo de investigación. Esta investigación es de tipo explicativo, de carácter exploratorio.

5.3.2 Trabajo de campo

5.3.2.1 Recolección de recursos forrajeros: Se identificó la época óptima de corte o pastoreo de cada uno de los recursos alimenticios a evaluar, a fin de desarrollar un muestreo teniendo en cuenta el manejo habitual dado a las praderas y a los

¹⁴² DIARIO EL ESPECTADOR. Bogotá D.C. Noviembre de 2008. Atlas del Estudiante. Dorling Kindersley.

¹⁴³ INSTITUTO GEOGRAFICO AGUSTIN CODAZZI, IGAC. 2010

pastos de corte establecidos. Para el caso de las especies arbóreas y arbustivas, el indicador de edad de muestreo fue básicamente la información que se posee respecto de la planta en la bibliografía existente, donde las principales consideraciones son el corte en etapa de prefloración, dada la mayor concentración de nutrientes en hojas y tallos y menor de factores antinutricionales, además del manejo tradicional dado por los pobladores de la zona, para la cual la mayoría de las especies evaluadas son nativas.

5.3.2.2 Reconocimiento e identificación taxonómica de las especies forrajeras: Para efectuar el reconocimiento de las forrajeras, principalmente las de uso alternativo, de las que muy poca información existe, se tomó muestras de cada una (dos ejemplares), recopilando información de campo sobre hábitat, biotipo y algunos caracteres vegetativos y reproductivos no preservables, siguiendo la metodología y procedimientos clásicos para colección y clasificación taxonómica del Herbario de la Universidad de Nariño (PSO). Para el reconocimiento taxonómico se tuvo en cuenta la estratificación (arbórea, arbustiva y herbácea) determinada de acuerdo a su desarrollo vertical, clasificando a las especies mayores de 5 metros como arbóreas, de 2 a 5 metros como arbustivas y menores de 1 metro como herbáceas.

5.3.2.3 Determinación de la composición botánica del alimento base: Para éste proceso, se recogieron 20 muestras de las praderas establecidas con la mezcla básica, utilizando el sistema de aforos descrito por Sierra,¹⁴⁴ esto permitió obtener 10 kilos de muestra, la que una vez pesada y homogenizada se separó manualmente cada uno de los forrajes presentes y posterior a este proceso se pesó cada fracción por separado a fin de calcular su porcentaje en la muestra global.

5.3.2.4 Análisis bromatológico y de metabolitos secundarios: Se tomaron muestras de los trece tratamientos experimentales: T0: Mezcla: Raigrases (*Lolium sp.*), Saboya (*Holcus lannatus*), Trébol blanco (*Trifolium repens*), Azul Orchoro (*Dactylis glomerata*), Rábano forrajero (*Raphanus sativus L.*), Lengua de vaca (*Rumex sp.*) y Diente de león (*Taraxacum officinale*). T1: Raigrás (*Lolium multiflorum.*), T2: Alfalfa (*Medicago sativa*), T3: Brasilero (*Phalaris arundinacea*), T4: Te (*Otholobium munyense*), T5: Chilca colorada (*Baccharis latifolia H.B.K.*), T6: Abutilón (*Abutilon striatum van*), T7: Acacia negra (*Acacia decurrens*), T8: Rábano forrajero (*Raphanus sativus L.*), T9: Sauco (*Sambucus nigra*), T10: Altamisa (*Ambrosia arborescens Hill*), T11: Remolacha forrajera follaje (*Beta vulgaris*), T12:

¹⁴⁴ SIERRA, José Oscar. Monitoreo o aforo del rendimiento de forraje para el cálculo de la carga animal en sistemas de pastoreo racional y el ajuste de carga en pesajes intermedios. 2006. p 1 – 3

Remolacha forrajera fruto (*Beta vulgaris*). Para realizar los análisis bromatológicos y de metabolitos secundarios de la planta, las muestras de forraje se tomaron según el siguiente procedimiento: Para el muestreo de las praderas con mezclas, raigrases, alfalfa y brasilero que constituyen parcial o totalmente las dietas convencionales, se siguió la metodología descrita por Sierra¹⁴⁵ para aforar potreros, mediante el trazo de transeptos imaginarios en forma de zigzag en cuyas direcciones se lanzó el marco de 25x25 cm hasta recolectar una muestra de 500 gramos por cada pradera próxima al pastoreo. El sistema de manejo de praderas de la zona de estudio se estableció en 45 días de descanso para los raigrases, 60 días para la alfalfa y el brasilero y 30 días para las praderas con mezcla raigrás, saboya, trébol, rábano forrajero, pasto azul, diente de león y lengua de vaca (Tabla 4.).

Tabla 4. Edad de corte de los recursos forrajeros evaluados

Recurso	Clase	Característica de corte	Edad de corte
<i>Mezcla alimento base</i>	Herbáceas	Rebrote post pastoreo	35 días
<i>Mezcla Lolium sp.</i>	Herbáceas	Rebrote post pastoreo	45 días
<i>Medicago sativa</i>	Herbácea	Rebrote post corte	60 días
<i>Phalaris arundinacea</i>	Arbustiva	Prefloración	60 días
<i>Acacia decurrens</i>	Arbórea	Prefloración	90 días
<i>Raphanus sativus L.</i>	Herbácea	Prefloración	35 días
<i>Sambucus nigra</i>	Arbórea	Prefloración	90 días
<i>Otholobium munyense</i>	Arbustiva	Prefloración	90 días
<i>Baccharis latifolia H.B.K.</i>	Arbustiva	Prefloración	80 días
<i>Abutilon striatum van</i>	Arbustiva	Prefloración	90 días
<i>Ambrosia arborescens Hill</i>	Arbustiva	Prefloración	60 días
<i>Beta vulgaris follaje</i>	Herbácea	Macolla y desarrollo	135 días
<i>Beta vulgaris fruto</i>	Herbácea	tuberoso	135 días

Respecto a la altura de corte el mismo autor¹⁴⁶ afirma que la mayor uniformidad y el mayor compromiso entre altura de corte y precisión se consiguen con el corte uniforme a ras del suelo de todas las muestras, razón por la cual el corte se realizó de esa manera.

¹⁴⁵ *Ibid.*, p. 2

¹⁴⁶ *Ibid.*, p. 3

Para el caso de la arbóreas y arbustivas el proceso de muestreo se hizo según el método del árbol próximo, utilizado por N. Smith¹⁴⁷ el que consistió en iniciar las mediciones con un árbol o arbusto cualquiera que estaba en el interior de la mancha de árboles y a partir del cual se muestrearon todos aquellos que secuencialmente estuvieron más cerca, con la restricción de no volver a medir aquel que ya se midió, para lo cual se fueron marcando con cordeles de colores los que iban siendo muestreados.

La toma de la muestra se hizo de las ramas terminales del arbusto o árbol, el que se encontraba en etapa de prefloración para garantizar el equilibrio de nutrientes en las partes comestibles de la planta, en la muestra se incluyeron hojas y tallos, y se muestrearon al menos 4 árboles o arbustos por cada especie hasta completar el tamaño de muestra necesario. Las edades de corte de cada uno de los arbustos y árboles muestreados se describen en la tabla 4.

En los laboratorios especializados de la Universidad de Nariño se realizaron los análisis químicos proximales (AQP), que según las recomendaciones establecidas por la A.O.A.C. - OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS (1995)¹⁴⁸, incluyen el contenido de humedad (método 930.04), proteína cruda por el método de Kjeldahl (Nx6.25) (método 955.04), cenizas (por calcinación a 600°C) (método 930.05), extracto etéreo (método 962.09) y fibra bruta (método 920.39). La energía bruta (EB) se determinó por medio de bomba calorimétrica, las fracciones de fibra de acuerdo con el método de Goering y Van Soest (1970). Y por último se determinó el contenido de metabolitos secundarios de cada tratamiento según los siguientes métodos de identificación *Saponinas*: métodos de Espuma, Rosenthaler-Vainillina-Ácido Clorhídrico, Molisch, *Taninos*: métodos de Cloruro Férrico, Gelatina-sal, Acetato de plomo, *Esteroides*: métodos de Libermann, Burchard, Rosenheim y Salkowski, *Alcaloides*: métodos de Dragendorff, Wagner y Mayer.

5.3.3 Montaje y adecuación de la Técnica *In vitro* de producción de gases.

5.3.3.1 Alistamiento e instalación de materiales y equipos. Dos días antes del inicio del experimento se empezó la adecuación de los equipos y materiales

¹⁴⁷ SMITH V. N. Profesor de Genética y Mejoramiento Forestal. Universidad de Talca. Santiago de Chile. En metodologías para el muestreo para la selección de árboles. [online]. 1993. [Fecha de consulta 17 de Junio de 2010]. Disponible en internet: <<http://www.cesaf.uchile.cl/cesaf/n2/indice.htm>>.

¹⁴⁸ AOAC. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. 1995. International Suite 400. 2200 Wilson Boulevard. Arlington Virginia USA. 16th edition. p. 2.201-3.301.

necesarios para el desarrollo de la prueba. Inicialmente y dado que se requería de un equipo de baño maría termostataado con capacidad para la incubación de 100 botellas, del que no se disponía en la Universidad, fue necesario adaptar un sistema a base de un acuario de vidrio de 100 cm de largo por 35 cm de ancho y 35 cm de fondo al cual se le adecuó con la ayuda de un soporte en madera, el cabezote de un termostato con el cual fue posible conservar el agua en el interior a una temperatura de 39°C. El sistema además fue recubierto por todos los lados, incluyendo la tapa, con láminas de icopor de 1,2 cm de espesor a fin de evitar la pérdida de temperatura. En su interior se dispuso de una gradilla con orificios de 5,5 cm x 5,5 cm, construida en triplex de 0,5 cm de espesor, la que facilitó la disposición y estabilidad de las botellas que se mantuvieron en incubación.

Para la medición de la presión generada por la acumulación de gases en el interior de las botellas por efecto de la fermentación, se empleó un transductor de presiones de la marca Autonics con lector digital, el cual tuvo que ser conectado a una fuente de 15 voltios para su funcionamiento, la que se construyó específicamente para tal fin.

Las botellas empleadas para la incubación de las muestras fueron viales N20 con capacidad para 100 ml, en vidrio color ámbar de la marca Peldar, estas fueron previamente lavadas y secadas en estufa a temperatura de 105°C por 12 horas, luego fueron rotuladas con la información de cada tratamiento y cada inóculo a correr en la prueba, antes de introducirles la muestra de cada sustrato.

Los frascos para muestreo de gases, viales N20 de 10 ml de capacidad, de marca Peldar y en vidrio color ámbar, fueron previamente lavados y secados en estufa a 105°C por 12 horas, y posteriormente fueron rotulados y sellados con corchos plásticos y sello de aluminio. Una vez sellados se les ajustó la presión interna a cero, con la ayuda del transductor de presión conectado a una jeringa.

5.3.3.2 Pesaje de muestras. 1 gramo de cada sustrato fue pesado y posteriormente colocado en las botellas por duplicado, para un total de 26 botellas por cada inóculo. Para el caso de los estándares se emplearon muestras de *Desmodium heterocarpun* y *Brachiaria humidicola* donadas por el CIAT, de las cuales se pesó igualmente 1 gramo y se depositó en las botellas por duplicado para un total de 4 estándares por cada inóculo. Adicionalmente se incubaron 5 blancos por cada inóculo los cuales contenían medio de digestión e inóculo más no sustrato.

5.3.3.3 Preparación de reactivos. Un día antes del inicio de la prueba se preparó el medio de digestión para 100 botellas, el que estaba conformado por 1681 ml de agua destilada a la que se le adicionó triptycase peptona y 1,7 ml de solución micro-mineral la que se preparó a base de Calcium chloride 2-hydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Manganese chloride 4-hydrate ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), chloride 6-hydrate ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y chloride 6-hydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), además de adicionó 3400 ml de solución buffer (Amonium hydrogen Carbonate (NH_4HCO_3) e hydrogen Carbonate (NaHCO_3)), 3400 ml de solución macro mineral (Di-Sodium hydrogen Orthopospate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), di-hydrogen Orthopospate (KH_2PO_4) y Magnesium sulphate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)), y 17 ml de solución de resazurín. Todo esto se mezcló y gaseó con CO_2 y 85 ml fueron adicionados en cada botella con sustrato.

La solución reductora estaba compuesta por 400 ml de agua, cisteyna, NaOH 1M y Sodium sulphide, de la cual se adicionaron 4 ml en cada botella antes de ser selladas con el corcho plástico y el sello de aluminio con ayuda de un crimper sellador manual.

5.3.3.4 Colección y preparación de inóculos

- Inóculo ruminal: los animales donantes fueron 3 bovinos hembras de la raza Holstein con un peso promedio de 400 Kg. destinados al sacrificio, los cuales se encontraban en las instalaciones del Frigorífico Jongovito S.A. FRIGOVITO del municipio de Pasto. Estos llegaron dos días antes del sacrificio y desde entonces fueron sometidos a alimentación en pastoreo a base de pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). El día del sacrificio fueron ingresados al corral de espera para ser sacrificados y tras el proceso de insensibilización, degüello, descuere y eviscerado el que tuvo una duración aproximada de 15 minutos, se colectó el contenido ruminal tan pronto fue abierto el rumen en la sala de vísceras, éste se depositó en una garrafa térmica precalentada a 39°C y fue transportado al laboratorio de nutrición animal de la Universidad de Nariño. El transporte tuvo una duración de 30 minutos. En el laboratorio, el contenido ruminal se filtró a través de un paño de gasa de cuatro capas, el material filtrado fue transferido a un recipiente mantenido en baño maría a 39°C y continuamente saturado con CO_2 . Este procedimiento se realizó para garantizar que el inóculo resultante estuviera compuesto por microorganismos ruminales adheridos y no adheridos a la fibra.

- Inóculo fecal. Los animales donantes fueron 3 vacas Holstein de 450 Kg de peso promedio, mantenidas en la Granja Experimental Botana, propiedad de la Universidad de Nariño, ubicada en el kilómetro 7, por la vía panamericana que conduce a Ipiales, desviándose a lado izquierdo en la carretera, 1,5 kilómetros por la vía que lleva a la vereda el Campanero, a una altura de 2800 msnm, con temperatura media de 10°C, precipitación promedio anual de 1000 mm y ubicada dentro de una zona de vida bmh-M. (Bosque muy Húmedo - Montano).

La dieta de los donantes consistió de pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) de 45 días de edad suministrado por un periodo de 8 días anteriores a la colecta de las heces.

El inóculo fue colectado el día del inicio del experimento. La colecta de las heces se realizó a las 10:00 horas de la mañana mediante la técnica *per rectum*, estas fueron colocadas en una garrafa térmica precalentada a 39°C, e inmediatamente transportadas al laboratorio de nutrición animal de la Universidad de Nariño, el transporte tuvo una duración de 35 minutos. En el laboratorio, las heces se filtraron a través de un paño de gasa de cuatro capas, el material filtrado fue transferido a un recipiente mantenido en baño maría a 39°C y continuamente saturado con CO₂. Este procedimiento se realizó para garantizar que el inóculo resultante estuviera compuesto por microorganismos ruminales adheridos y no adheridos a la fibra¹⁴⁹.

5.3.4 Trabajo de laboratorio

5.3.4.1 Inoculación de sustratos. Las botellas fueron divididas en 2 grupos para la inoculación dado que se evaluarían 2 tipos de inóculos. Cada botella conteniendo el sustrato, el medio de digestión y el agente reductor, fue aclimatada a 39°C tras su introducción en el baño maría y posteriormente se les inyectó 10 ml de inóculo, ruminal para el caso del grupo I y fecal para el grupo II respectivamente. La incubación de los sustratos dio inicio a las 9:30 horas del día 1 para el grupo I y las 12:00 horas para el grupo II.

¹⁴⁹ THEODOROU M, K., WILLIAMS B, A., DHANOA M, S., MCALLAN A, B., FRANCE J. A Simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Anim Feed Sci and Technol 1994; 48:185-197.

5.3.4.2 Lecturas de presión y volumen de gas. Para las mediciones de presión la aguja acoplada a la válvula fue insertada a través de la tapa de caucho, y para la medición del volumen, los gases acumulados en la parte superior se retiraron con el uso de la jeringa hasta el momento en que la presión registrada en el lector alcanzó a ser cero. Las lecturas se realizaron en los horarios 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 19, 24, 30, 36, 48, 72 y 96 horas y los datos obtenidos fueron transferidos a un computador para su análisis posterior. Este proceso se repitió en todos los frascos de cada caja y después de las lecturas ellos fueron manualmente agitados y reubicados en el baño maría.

5.3.4.3 Muestreo de gases para cromatografía (Determinación de metano). Una botella adicional por cada sustrato e inóculo empleados fue incubada en un grupo adjunto. De estas se tomaron las muestras de gases acumulados en el interior mediante la succión con una jeringa, la que luego se empleó para depositar la muestra extraída en viales de 10 ml, los que inmediatamente después fueron refrigerados a 4°C hasta tanto las muestras fueron analizadas.

5.3.4.4 Muestreo de sobrenadante para cromatografía (Determinación de AGV's). Al culminar las 96 horas del proceso fermentativo, las botellas adicionales fueron destapadas y con ayuda de una micropipeta, se tomó una muestra de sobrenadante de 2 ml, de cada una, las que fueron depositadas en tubos de ensayo de vidrio de 10 ml con tapa rosca previamente lavados y rotulados e inmediatamente refrigeradas a 4°C.

5.3.4.5 Finalización de la prueba. A las 9:30 horas y 12:00 horas del día 5 de incubación para el grupo I y II respectivamente, la prueba se dio por concluida. Las botellas fueron llevadas a refrigeración hasta tanto los residuos pudieran ser filtrados.

5.3.4.6 Filtrado y secado de residuos. Una serie de crisoles fueron previamente adecuados con fibra de vidrio como base, rotulados, tarados a 600°C en mufla y a 105°C en estufa, y luego pesados para el filtrado de los residuos contenidos en cada una de las botellas de incubación. Para el filtrado se empleó un sistema de matraces con orificio de salida lateral, y las muestras fueron lavadas con abundante agua caliente y luego llevadas a estufa a 105°C hasta peso constante.

5.3.4.7 Determinación de la degradabilidad de la Materia Seca (MS) y Materia Orgánica (MO). Para la determinación de la degradabilidad de la MS y MO a la hora 6 y 96 de incubación de cada uno de los sustratos evaluados, el material degradado se calculó por diferencia de pesos entre los crisoles vacíos y los crisoles con residuo tras el secado en estufa y en mufla respectivamente. Los porcentajes de degradabilidad fueron calculados con base en 1 gramo de muestra inicial y corregidos por el promedio de residuos de los 5 blancos incubados por cada inóculo.

5.3.4.8 Cromatografía de gases. Para el análisis de metano, las muestras fueron extraídas de los viales con ayuda de una jeringa Headspace Soil gas SUPELCO para cromatografía de gases, e inyectadas en un cromatógrafo SHIMADZU GC-17A. Se tomaron 5 ml de muestra de los cuales se inyectaron 0,5 ml. La columna empleada fue una columna apolar DB-5 (30 metros 0,25 mm y 0,25 μ m J&W). Las temperaturas del puerto de inyección Split/Splitless y detector FID fueron 200 y 250°C respectivamente, se realizó una programación de temperatura de la columna de 30°C (5min) hasta 200°C a relación de 30°C/min. Como gas de arrastre se empleó Helio UAP a flujo de columna de 1,0 mL/min. El tiempo de retención del metano fue de 1,80 minutos. El software utilizado para la adquisición y el análisis de la información fue el CLASS VP versión 4,3.

Para la determinación de AGV's, las muestras de sobrenadante obtenidas de cada botella fueron sometidas al siguiente procedimiento:

A los 2 ml de sobrenadante de cada muestra se les adicionó 2 ml de ácido fosfórico al 30% y se refrigeró a 4°C. Tras la refrigeración las muestras se centrifugaron a 8000 g (7516 rpm) por 10 minutos a fin de separar sólidos de líquidos. La fase líquida de cada muestra se transfirió a nuevos tubos de ensayo y se congeló durante 12 horas.

Posteriormente a cada muestra se le adicionaron 2 ml de éter etílico y se agitó manualmente por espacio de 3 minutos liberando el gas producido de forma gradual. Nuevamente las muestras se refrigeraron por 24 horas, al cabo de las cuales se separó la fase etérea y de quelatos de los tubos, a cuyas porciones se le adicionó 1 ml de solución de NaCl al 10%, se agitó y se refrigeró por 3 horas con el fin de permitir mayor diferenciación de la fase etérea.

Posteriormente las muestras se sonicaron en un equipo de ultrasonido FISHER aproximadamente por 15 minutos a temperatura ambiente, y se separó la fase etérea para el análisis de AGV's.

El procedimiento siguiente fue derivatizar mediante la adición de 5 ml de metanol ácido clorhídrico al 5% v/v, las muestras se dejaron durante 8 horas a 50°C en baño de aceite controlando la temperatura, posteriormente se adicionó 1 ml de agua destilada y 1mL de n-Pentano de alta pureza (99,99%) para separar los Esteres metílicos de los AGV's. El extracto orgánico se guardó en refrigeración para su posterior análisis por Cromatografía de gases.

Para el análisis en el cromatógrafo se utilizó una Columna Capilar Supelcowax-10 (Supelco 30m, 0,25mm, 0,25 µm). La programación de temperatura fue de 40°C hasta 130°C (15°C/min) luego hasta 240°C a 30°C/min. Se utilizó un detector FID a 280°C. La temperatura del inyector split 1:10 fue de 250°C y el volumen de inyección de 1 µL.

Se realizó inyección de estándares de ácido Acético, Propiónico, Butírico y Valérico (Metil ester) analizados bajo las mismas condiciones.

5.4 VARIABLES EVALUADAS

5.4.1 Composición botánica del alimento base. Se determinó mediante el muestreo permanente a lo largo de dos ciclos de pastoreo de aquellos potreros con establecimiento del alimento base. La metodología empleada fue pesaje inicial de toda la muestra homogénea con la posterior separación de cada una de las especies que la componían, pesaje y estimación del porcentaje dentro de la muestra global.

5.4.1 Clasificación taxonómica. Una muestra que incluía raíces, tallos, hojas, flores y frutos de cada especie evaluada fue llevada al Herbario de la Universidad de Nariño para su respectiva identificación.

5.4.2 Contenido nutricional. Esta variable se evaluó con el fin de caracterizar la calidad composicional de cada sustrato evaluado y correlacionarla con la producción de GEI.

La determinación se hizo mediante análisis proximal o de Weende para materia seca, extracto etéreo y cenizas; fibra cruda por digestión ácido – básica bolsas Ankom; nitrógeno total por Kjeldahl; energía por bomba calorimétrica; FDN, FDA, hemicelulosa, celulosa y lignina por Van Soest; minerales: Ca, P y Mg por oxidación húmeda EAA y colorimetría en espectrofotometría de absorción atómica.

5.4.3 Metabolitos secundarios. Esta variable se evaluó principalmente con el fin de identificar la presencia de sustancias taníferas en los sustratos evaluados, como indicador potencial en la reducción de la producción de GEI. Los métodos empleados para su determinación fueron:

- a. Saponinas: métodos de Espuma, Rosenthaler-Vainillina-Ácido Clorhídrico, Molisch.
- b. Taninos: métodos de Cloruro Férrico, Gelatina-sal, Acetato de plomo.
- c. Esteroides: métodos de Libermann Burchard, Rosenheim y Salkowski.
- d. Alcaloides: métodos de Dragendorff, Wagner y Mayer.

5.4.4 Producción de gas e identificación de las fracciones de metano generadas por cada dieta. Tanto la presión como el volumen de gas producidos por cada sustrato en los 15 horarios de toma de lecturas, fueron inicialmente corregidos con base en el promedio de los valores de las mismas variables registradas para los blancos incubados por cada inóculo, de tal manera que los datos correspondan a la producción de gas y presión producidos por la fermentación de los sustratos sin incluir el efecto de los inóculos.

Una corrección adicional se efectuó con base en los estándares empleados (*Desmodium heterocarpon* y *Brachiaria humidicola*), cuya información de producción de gas y presión fue suministrada por el laboratorio de calidad de forrajes del CIAT, a fin de determinar la confiabilidad de los inóculos empleados. Los datos obtenidos para la prueba se hallaron entre el 90 y 95% de los valores de los estándares y por ello los inóculos se catalogaron como aceptables y las corridas de cada sustrato fueron tomadas como normales.

Para la determinación de metano, del total de gas producido por cada sustrato, se analizó una muestra de 0,5 ml la que permitió establecer inicialmente picos de producción de CH₄, con base en cuya información y tras establecer el área de los mismos en cada cromatograma y con la ayuda de un patrón que empleó el área de metano al 90% como factor de corrección se obtuvo la producción del gas en unidades volumétricas por gramo de materia seca.

5.4.5 Degradación *In vitro* de la materia seca (MS) y la materia orgánica (MO). La degradación de la MS y MO se determinó a fin de estimar la viabilidad de los inóculos empleados en la prueba. El procedimiento consistió en cálculos matemáticos basados en la diferencia de pesajes de los crisoles en los que se filtraron los residuos de incubación.

5.4.6 Producción de ácidos grasos volátiles (AGV's). La relación en la producción de ácidos grasos volátiles a nivel ruminal es decisiva en la generación de hidrógenos libres que serán transformados por las bacterias metanogénicas en sustancias como CH₄, lo que además de ocasionar pérdida energética para el animal, influye negativamente sobre el medio ambiente.

La cuantificación de AGV's se realizó mediante cromatografía de gases por inyección líquida, para lo cual se inyectaron 2 µL de muestra y con los cromatogramas obtenidos se cuantificó la producción volumétrica de acetato, butirato y propionato principalmente según un factor de corrección establecido para dichos compuestos a través de curvas de calibración de los mismos en sus formas Metil ésteres.

5.5 MATERIALES Y EQUIPOS

A lo largo del desarrollo del proyecto se emplearon los siguientes materiales y equipos:

5.5.1 Recolección de muestras en campo

- Marco para aforo de 25 cm x 25 cm

- Hoz
- Bolsas de papel
- Libreta de notas y lápiz
- Machete
- Metro
- Navaja
- Tijeras de podar
- Hojas de papel periódico
- Marcadores
- Cordeles de colores
- Cámara fotográfica
- Balanza gramera

5.5.2 Trabajo de laboratorio

- Balanza analítica
- Frascos plásticos
- Transductor de presiones
- Viales N20 de 100 ml
- Corchos plásticos
- Sellos de aluminio
- Acuario recubierto en icopor
- Baño maría
- Cabezote de termostato
- Gradilla en triplex

- Crimper sellador manual de 20 mm
- Fuente de energía de 15 V
- Termómetro de aguas
- Nevera
- Baldes de 5 litros
- Bandejas
- Embudo
- Beakers de 2000, 1000, 500, 200, 50 y 10 ml
- Pipetas de 1, 5 y 10 ml
- Probetas de 100 ml
- Goteros
- Vasos plásticos
- Botellón de 20 litros
- Bala de CO₂
- Papel aluminio
- Garrafas térmicas de 1,5 litros
- Gasa
- Jeringas plásticas de 50, 20, 10 y 5 ml
- Válvula de 3 salidas
- Viales N20 de 10 ml
- Cortafrío
- Tubos de ensayo de vidrio con tapa rosca
- Gradillas para tubos de ensayo
- Soporte en madera
- Jeringa para muestreo de gases SUPELCO®

- Crisoles
- Fibra de vidrio
- Computador
- Calculadora
- Guantes
- Tapabocas
- Mangas de inseminación

5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de producción de gas obtenidos para cada tratamiento después del periodo de fermentación de 96 horas, fueron analizados mediante análisis de medidas repetidas en el tiempo (PROC MIXED SAS 9.1) a fin de determinar las diferencias existentes entre el efecto del inóculo y entre los sustratos e identificar aquellos con mayor producción de gas según el tipo de inóculo utilizado. Las medias se ajustaron y compararon según la prueba de Tukey - Kramer ($p < 0,05$). El mismo análisis fue empleado para la evaluación de la degradabilidad de MS y MO.

Modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + \lambda_i + \varepsilon_{ij} + tk + (T * t)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk}	=	Observación ijk
μ	–	Media general
λ_i	=	Efecto del tratamiento
tk	=	Efecto del horario de incubación k
$(T * t)_{ik}$	=	Efecto de interacción entre el tratamiento i y el horario k
ε_{ij}	=	Error aleatorio con μ cero y δ^2 y covarianza entre medias repetidas
ε_{ijk}	=	Error aleatorio

Tratamientos

- T0** Alimento base: Mezcla Raigrases (*Lolium sp.*), Saboya (*Holcus lannatus*), Trébol blanco (*Trifolium repens*), Azul Orchoro (*Dactylis glomerata*), Lengua de vaca (*Rumex sp.*), Diente de león (*Taraxacum officinale*), Rábano forrajero (*Raphanus sativus L.*).
- T1** Mezcla de Raigrases (*Lolium sp.*)
- T2** Alfalfa (*Medicago sativa*)
- T3** Brasilero (*Phalaris arundinacea*)
- T4** Te (*Otholobium munyense*)
- T5** Chilca colorada (*Baccharis latifolia H.B.K.*)
- T6** Abutilón (*Abutilon striatum van*)
- T7** Acacia negra (*Acacia decurrens*)
- T8** Rábano forrajero (*Raphanus sativus L.*)
- T9** Sauco (*Sambucus nigra*)
- T10** Altamisa (*Ambrosia arborescens Hill*)
- T11** Remolacha forrajera follaje (*Beta vulgaris*)
- T12** Remolacha forrajera fruto (*Beta vulgaris*)

Los datos de presión y volumen obtenidos durante el proceso fermentativo, con ambas fuentes de inóculo, fueron utilizados para establecer una ecuación de regresión utilizando PROC REG también del programa estadístico SAS.

Modelo matemático

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_i$$

Para las variables, contenido nutricional, contenido de metabolitos secundarios, producción de metano (ppm/g MS) y producción de AGV's (ppm/g MS) se realizaron análisis de tipo comparativo.

6. PRESENTACION Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 COMPOSICIÓN BOTÁNICA DEL ALIMENTO BASE

Los resultados obtenidos para esta variable se observan en la tabla 5.

La mayor proporción dentro de las praderas evaluadas fue de las especies *Lolium sp.* con un 53.26%, siendo evidente la predominancia de especies introducidas como en este caso de tetraploides, lo que es común de encontrar en estas zonas dedicadas a la actividad ganadera, donde por las condiciones agroclimáticas no es factible a nivel de adaptabilidad ni rendimiento productivo, el cultivo de otras especies naturalizadas como es el caso del *Pennisetum clandestinum*, todo esto sumado a la arraigada cultura de utilización de especies foráneas.

Tabla 5. Composición Botánica del alimento Base (T₀)

Especie	Nombre científico	% en la pradera
Lengua de vaca	<i>Rumex sp.</i>	1.08
Diente de león	<i>Taraxacum officinale</i>	1.10
Rábano forrajero	<i>Raphanus sativus L.</i>	3.35
Trébol blanco	<i>Trifolium repens</i>	6.43
Pasto Saboya	<i>Holcus lannatus</i>	9.78
Pasto azul orchoro	<i>Dactylis glomerata</i>	25.00
Raigrases	<i>Lolium sp.</i>	53.26
Total		100

Sin embargo, la diversidad de las praderas encontradas en esta investigación es alta, ya que persiste en menor porcentaje la presencia de especies naturalizadas como *Dactylis glomerata*, *Holcus lannatus* y *Trifolium repens*, junto a otras introducidas, como *Raphanus sativus*, las que con el objeto de procurar volúmenes adecuados de biomasa forrajera para el sostenimiento de los animales, se incorporan a las praderas, aunado al aprovechamiento de arvenses de crecimiento esporádico como *Rumex sp.* y *Taraxacum officinale*.

6.2 CLASIFICACION TAXONÓMICA

Los resultados obtenidos para la clasificación taxonómica de las especies muestreadas en la presente investigación, se indican en la tabla 6. Fueron identificadas ocho familias a las que pertenecen las diversas especies evaluadas: Poaceae, Fabaceae, Asteraceae, Malvaceae, Mimosaceae, Brassicaceae, Caprifoliáceae y Chenopodiaceae.

Tabla 6. Clasificación taxonómica de los recursos forrajeros evaluados

Familia	Orden	Nombre científico	Nombre común
Poaceae	Cyperaceae	<i>Lolium sp.</i>	Raigrases
Fabaceae	Fabales	<i>Medicago sativa</i>	Alfalfa
Poaceae	Poales	<i>Phalaris arundinacea</i>	Brasilero
Fabaceae	Fabales	<i>Otholobium munyense</i>	Té
Asteraceae	Asterales	<i>Bracharis latifolia H.B.K.</i>	Chilca colorada
Malvaceae	Malvales	<i>Abutilon striatum van</i>	Abutilón
Mimosaceae	Fabales	<i>Acacia decurrens</i>	Acacia negra
Brassicaceae	Brassicales	<i>Raphanus sativus L.</i>	Rábano forrajero
Caprifoliáceae	Dipsacales	<i>Sambucus nigra</i>	Sauco, canillero
Asteraceae	Asterales	<i>Ambrosia arborescens Hill</i>	Altamisa, marco
Chenopodiaceae	Caryophyllales	<i>Beta vulgaris</i>	Remolacha forrajera

Fuente: Herbario Universidad de Nariño

Dos especies pertenecen a la familia de las Poáceas; las que se caracterizan por ser plantas casi siempre herbáceas, anuales o perennes, presentando una estructura floral muy característica, agrupándose las flores en espiguillas,¹⁵⁰ siendo identificados para este caso la mezcla de Raigrases (*Lolium sp.*) y el pasto Brasilero (*Phalaris arundinacea*).

Tres especies pertenecen a las familias Fabácea y Mimosácea respectivamente, de las que según Preston y Rosales citados por Luna y Guerrero,¹⁵¹ se dice que:

¹⁵⁰ HERBARIO UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA. Familia Poaceae. [En línea] [Citado 4 de agosto de 2011] disponible en internet: <http://www.unavarra.es/servicio/herbario/htm/Gramineae.htm>

¹⁵¹ LUNA, M, A., GUERRERO, I, P. Reconocimiento, Identificación Taxonómica y Análisis Bromatológico de Arvenses con potencial forrajero, para la Alimentación de Bovinos y Ovinos de Carne, en la Zona de Bosque Muy Seco Tropical (Bms-T); Veredas Remolino (Nariño), Mojarras y

las leguminosas, cuyas familias Fabaceae, Mimosaceae y Caesalpinaceae se caracterizan por presentar niveles altos de nitrógeno, que se expresan como proteína. Para la presente caracterización se encontraron a *Medicago sativa* y *Otholobium munyense* dentro de la familia de las Fabáceas, y *Acacia decurrens* perteneciente a la familia Mimosáceas del orden de las Fabales.

Las Asteráceas son una familia diversa que incluye plantas de todas las formas y tamaños. La mayor parte son plantas de distintos tipos, pero también hay muchos arbustos, trepadoras y árboles.¹⁵² En este caso se encontraron los arbustos *Baccharis latifolia* H.B.K. y *Ambrosia arborescens* Hill.

Las malváceas (Malvaceae) son una familia de plantas perteneciente al orden de las malvales. Reúnen plantas herbáceas, leñosas o arbustos (más frecuentes en países cálidos)¹⁵³. Dentro de este grupo se encontró a *Abutilon striatum* van.

Las Brassicáceas (Brassicaceae) o crucíferas (Cruciferae) son una familia de angiospermas dicotiledóneas que se incluyen en el orden Brassicales. Constituyen un grupo monofilético con cerca de 338 géneros y 3.709 especies de plantas principalmente herbáceas distribuidas en todo el planeta, si bien están particularmente concentradas en áreas templadas y frías. Incluyen cultivos de importancia económica, tanto hortícolas, como ornamentales, oleaginosos, forrajeros y como condimentos. La familia Brassicaceae comprende numerosas especies de variados usos para el hombre, como alimento fresco e industrializado, y como plantas forrajeras, medicinales y ornamentales, destacando los géneros *Brassica* y *Raphanus* como los más difundidos y utilizados. En este trabajo se encontró una especie perteneciente a esta familia, que fue *Raphanus sativus* L, comúnmente conocida como rábano forrajero¹⁵⁴.

El Vado (Cauca). San Juan de Pasto: Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Pecuarias. Tesis de grado presentada como requisito para optar al título de Zootecnista. 2009. 165 p.

¹⁵² ORGANIZACIÓN PARA LA EDUCACIÓN Y PROTECCIÓN AMBIENTAL. OPEPA. [En línea] [citado 4 de agosto de 2011] disponible en internet: <http://www.opepa.org/index.php?option=com_content&task=view&id=435&Itemid=30>

¹⁵³ STACEY D. SMITH AND DAVID A. BAUM. Core Malvales. Version 25 March, 2003. In: The Tree of Life Web Project. [En línea] [citado 8 de agosto de 2011] disponible en internet: <http://tolweb.org/Core_Malvales/21172.>

¹⁵⁴ PONTIFICA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE. Productos hortícolas de la familia Brassicaceae. [En línea] [citado 8 de agosto de 2011] disponible en internet: <http://www.uc.cl/sw_educ/hort0498/HTML/p019.html.>

Las caprifoliáceas (Caprifoliaceae) son una familia de plantas dicotiledóneas perteneciente al orden Dipsacales. También se la conoce como la familia de las madre selvas. Este clado agrupa unas 380 especies, en 10 géneros, con una extensa área de distribución. Estas plantas son en su mayoría arbustos y parras, raramente hierbas, incluyendo algunas plantas ornamentales de jardín en regiones templadas. Las hojas son mayormente opuestas sin estípulas, y pueden ser o perennifolios o caducifolios. Las flores son tubulares con forma de embudo o parecidas a campanas, normalmente con cinco lóbulos vueltos hacia fuera, y casi siempre con fragancia. El fruto es en la mayoría de los casos una baya o una drupa¹⁵⁵. Dentro de este grupo se encontró a la especie *Sambucus nigra*, conocida como Sauco.

Especies de la familia de las Chenopodáceas, tienen un período vegetativo de 5 a 8 meses y en condiciones óptimas puede llegar a medir 2.5 metros de altura. Tienen raíz pivotante. El tallo es de sección circular cercano a la raíz y es angular a la altura donde nacen las ramas y hojas.¹⁵⁶ La especie de esta familia identificada en esta investigación y perteneciente al orden de las Caryophyllales es la Remolacha forrajera (*Beta vulgaris*).

La mayoría de estas especies se consideran como típicas, dado que siempre han estado presentes en el medio, sin embargo no se ha hecho uso de sus potencialidades y sólo en la actualidad existen procesos de reconocimiento de sus cualidades nutricionales y de incorporación paulatina en los sistemas de producción ganadera dados los múltiples beneficios que pueden ofrecer. Su característica más importante radica en el potencial que poseen como recursos propios de estas zonas de vida lo que facilita su difusión.

No es el caso de *Medicago sativa*, *Phalaris arundinacea* y *Beta vulgaris*, que desde hace muchos años se han considerado como recursos básicos en la dieta

¹⁵⁵ BREMER B., BREMER K., MARK W. CHASE, MICHAEL F. FAY, JAMES L. REVEAL, DOUGLAS E. SOLTIS, PAMELA S. SOLTIS Y PETER F. STEVENS. The Angiosperm Phylogeny Group III. 2009. «An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society p. 105-121. [En línea] [citado 8 de agosto de 2011] disponible en internet: <<http://www3.interscience.wiley.com/journal/122630309/abstract>>

¹⁵⁶ UNIVERSIDAD DE CHILE. Laboratorio de relación suelo – agua – planta. Facultad de Ciencias agrónomas. [En línea] [citado 4 de agosto de 2011] disponible en internet: <http://www.sap.uchile.cl/descargas/publicacion/Evaluaci%F3n__del_Rendimiento_Potencial_y_Bajo_estr%E9s_h%EDdric-1.pdf>

del ganado lechero y de los que cabe resaltar que también forman parte de un amplio grupo de especies introducidas en los sistemas ganaderos.

6.3 CONTENIDO NUTRICIONAL

En la tabla 7 se presenta la composición bromatológica de los recursos forrajeros evaluados mediante la técnica *In vitro* de producción de gases.

- PROTEINA

Los niveles más altos se presentaron en las especies *Ambrosia arborescens* (30,30%), *Otholobium munyense* (29,50%) y *Raphanus sativus L* (26,30%), correspondientes a los tratamientos T₁₀, T₄ y T₈ respectivamente, en tanto que los valores más bajos fueron para el fruto de *Beta vulgaris* (11,60%) correspondiente al T₁₂.

Según Rosero,¹⁵⁷ el potencial de producción y calidad de los recursos forrajeros depende del género, especie y cultivar, edad y estado fisiológico de la planta, de las propiedades químicas y físicas del suelo, de las condiciones climáticas y por supuesto un factor muy importante a considerar es el manejo al cual está siendo sometida una determinada especie.

El contenido de proteína encontrado en esta investigación para *Ambrosia arborescens*, es similar al reportado por Rúales *et al*,¹⁵⁸ quienes caracterizaron ésta especie para la misma zona de estudio.

El contenido de proteína de *Otholobium munyense* fue más alto que el hallado por Rúales *et al*¹⁵⁹, que fue de 19,43% en base seca. Las causas de esta diferencia

¹⁵⁷ ROSERO N. R. Suplementación de bovinos a pasto. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Antioquia. 2005.

¹⁵⁸ RUALES DEL CASTILLO, L.C., RECALDE A., DIAZ VELASQUEZ M. Caracterización de especies silvestres arbóreas y arbustivas con potencial forrajero en la zona de influencia de la granja lechera Chimangual. Especialización en producción de recursos alimentarios para especies pecuarias. Universidad de Nariño. 2010.

¹⁵⁹ *Ibíd.*

Tabla 7. Composición bromatológica de los recursos forrajeros evaluados (% en BS)

Recurso Forrajero	Nombre científico	MS	MO	CENIZAS	PC	FDN	FDA	
		%	%	%	%	%	%	
T0	Alimento Base	20,60	91,90	8,10	22,60	49,30	24,60	
T1	Mezcla de Raigrases	<i>Lolium multiflorum</i>	14,40	89,80	10,20	25,70	51,20	26,30
T2	Alfalfa	<i>Medicago sativa</i>	23,30	91,94	8,06	25,80	35,00	22,50
T3	Brasilero	<i>Phalaris arundinacea</i>	15,40	86,80	13,20	23,30	53,00	30,20
T4	Té	<i>Otholobium munyense</i>	23,30	92,95	7,05	29,50	35,20	18,20
T5	Chilca colorada	<i>Baccharis latifolia</i>	23,40	90,05	9,95	17,30	45,70	31,40
T6	Abutilón	<i>Abutilon striatum van</i>	26,00	87,30	12,70	22,00	67,00	20,30
T7	Acacia negra	<i>Acacia decurrens</i>	34,20	94,16	5,84	20,40	36,60	23,60
T8	Rábano Forrajero	<i>Raphanus sativus L</i>	10,90	83,00	17,00	26,30	52,40	27,40
T9	Sauco	<i>Sambucus nigra</i>	19,60	89,80	10,20	21,10	23,40	15,80
T10	Altamisa	<i>Ambrosia arborescens</i>	21,00	87,20	12,80	30,30	44,90	31,10
T11	Remolacha forrajera follaje	<i>Beta vulgaris</i>	7,52	73,90	26,10	23,00	32,80	23,00
T12	Remolacha forrajera fruto		8,93	89,10	10,90	11,60	15,90	8,56

Fuente: Laboratorios Especializados Universidad de Nariño, 2011.

pueden estar asociadas al estado de la planta al momento del corte, el sitio de muestreo, la edad, la parte de la planta, la época del año, entre otros factores.

Según Vargas y Delgadillo 1998,¹⁶⁰ los árboles y arbustos forrajeros se pueden distribuir en diferentes estratos para calificar su potencial como suplemento proteico: súper alto > 30% de proteína, muy alto 25-30% de proteína, alto 20-24% de proteína, mediano 15-19% de proteína, bajo 10-14% de proteína y muy bajo < 10% de proteína. Según lo anterior el 85% de las especies arbóreas y arbustivas evaluadas se clasifican dentro de los grupos de alto, muy alto y súper alto potencial proteico.

En el caso de *Raphanus sativus L.*, los resultados fueron similares a los reportados por Mattos *et al.*,¹⁶¹ en investigaciones desarrolladas en cultivos bajo sistemas de labranza mínima. Respecto al fruto de *Beta vulgaris*, este fue concordante con las características de la especie, ya que éste tubérculo mejora el aporte energético, gracias a su elevado contenido de carbohidratos de fácil asimilación en forma de azúcares simples, característica que según Hanssen y Quintero¹⁶² lo convierten en una materia prima de uso potencial en la producción de bioetanol carburante.

- FIBRA DETERGENTE NEUTRA (FDN)

El contenido de FDN, fue relativamente alto en comparación a las demás especies evaluadas en *Abutilon striatum van* (67%) y *Phalaris arundinacea* (53%), T₆ y T₃ respectivamente. Los valores más bajos se presentaron en el fruto de *Beta vulgaris* (15,90%) T₁₂, y *Sambucus nigra* (23,40%), T₉.

¹⁶⁰ VARGAS Julio, DELGADILLO Lucia. Plantas forrajeras utilizadas por campesinos para alimentar animales en el Valle del Cauca. Cali – Valle. CIPAV. 1998. 50 p.

¹⁶¹ MATOS, A. A., OJEDA, Á., CARDOZO, A. R. Composición química, degradabilidad y producción de gas *In vitro* del follaje de doce cultivares de Rábano forrajero (*Raphanus sativus L.*). Revista Cubana de Ciencia Agrícola, vol. 44, núm. 3, 2010, pp. 261-266 Instituto de Ciencia Animal La Habana, Cuba.

¹⁶² HANSEN VILLAMIZAR, Henry, QUINTERO BERTEL, Quelbis Román. Resultados preliminares del proyecto de investigación financiado por el sistema universitario de investigaciones de la Universidad Autónoma de Colombia. Obtención de bioetanol carburante a partir de la remolacha (*Beta vulgaris L.*). Santa Fe de Bogotá. Colombia. 2006.

El contenido de FDN en las plantas agrupa las fracciones de Celulosa Hemicelulosa y Lignina, razón por la cual y según lo que afirma Sánchez 1976¹⁶³, en el caso de las plantas tropicales, el contenido de FDN se incrementa con la presencia de tallos. Lo anterior explica los resultados obtenidos para *Abutilón striatum van* y *Phalaris arundinacea*, que son plantas que se caracterizan por la alta relación de tallos en su estructura, en tanto que el bajo contenido encontrado para el fruto de *Beta vulgaris* se explica porque es un tubérculo cuya principal composición es de carbohidratos solubles junto con un elevado contenido de agua.

El contenido de FDN, reportado para *Abutilon striatum van* es similar al encontrado por Lotero¹⁶⁴, para zonas alto-andinas de Colombia.

Laredo y Cuesta¹⁶⁵ reportan contenidos de FDN similares a los de esta investigación para *Phalaris arundinacea* al comparar la calidad nutricional de varias gramíneas y leguminosas en diferentes estados de desarrollo en la Sabana de Bogotá - Colombia.

Álvarez¹⁶⁶ afirma, que árboles forrajeros con bajos contenidos de FDN (20% - 35%) presentan usualmente alta digestibilidad. Considerando al Sauco (*Sambucus nigra*), que según el análisis bromatológico presentó un contenido de FDN de 23.40%, como un recurso que se puede convertir en una especie de elevado potencial forrajero, con un aporte nutricional y de reducción de emisiones de gas significativo como se verá más adelante.

¹⁶³ SÁNCHEZ, J.E. Utilización del aserrín de pino (*Pinus ponderosa*) como sustituto de rastrojo de maíz en raciones para ganado de engorda. [En línea]. México 1976. [Citado 18 de agosto de 2011] disponible en internet: <<http://www.fao.org/DOCREP/006/Y4435S/y4435s0h.htm>>

¹⁶⁴ LOTERO, J. Producción, utilización y mejoramiento de los pastizales de las zonas alto andinas de Colombia. Red de pastizales Andinos. REPAAN. Quito, Ecuador. 1993. 155 pág.

¹⁶⁵ LAREDO, M. y CUESTA, P. 1988. Tabla de contenido nutricional en pastos y forrajes de Colombia. Instituto Colombiano Agropecuario. Programa de Nutrición Animal. Santa Fe de Bogotá, Colombia. 77 p.

¹⁶⁶ ALVAREZ N, Diana. M. Op. Cit., p. 37-42

- FIBRA DETERGENTE ACIDA (FDA)

Se encontró un mayor nivel para *Baccharis latifolia* (31,40%) y *Ambrosia arborescens* (31,10%), T₅ y T₁₀ y un menor tenor en el fruto de *Beta vulgaris* (8,56%) T₁₂, y *Sambucus nigra* (15,80%), T₉.

La FDA agrupa las fracciones de celulosa y lignina de las plantas, aumentando su proporción en aquellas de avanzado estado de maduración y alta relación de tallos a hojas, razón por la cual altas concentraciones de FDA se asocian con baja digestibilidad ruminal, pues al ser un constituyente de las paredes celulares la digestibilidad de la lignina es prácticamente nula. Con base en lo anterior se puede afirmar que el alto contenido encontrado en *Baccharis latifolia* y *Ambrosia arborescens* está asociado al estado de las plantas al momento del corte junto con la edad de rebrote de las mismas y la elevada presencia de tallos en su estructura, gran parte de los cuales pueden haberse encontrado lignificados.

Los bajos contenidos encontrados en *Beta vulgaris* se explican cómo se mencionó anteriormente por las características de la especie que al ser un tubérculo azucarero posee un bajo contenido de carbohidratos estructurales y en cuanto a *Sambucus nigra* principalmente por la estructura de la planta y las características de sus tallos los que toman cierto tiempo hasta lignificarse por lo cual es más amplio el periodo vegetativo de máximo aprovechamiento de la especie.

Torres *et al.*¹⁶⁷ encontraron contenidos de FDA para *Baccharis latifolia* de 32,36%, bajo condiciones de sistemas silvopastoriles tropicales. Ruales *et al.*¹⁶⁸, encontraron valores de FDA para *Ambrosia arborescens* similares a los encontrados en este trabajo.

¹⁶⁷ BALDERAS TORRES, A., ONTIVEROS ENRÍQUEZ, R., LOVETT, J. C., SKUTSCH, M. (2009). Estudio de la biomasa aérea arbórea en bosques de encino-pino en el Bosque La Primavera. Resultados preliminares. *I Simposio Mexicano del Carbono. Programa Mexicano del Carbono 7 al 9 de Octubre, 2009.* Ensenada México

¹⁶⁸ RUALES *et al.* 2010. Op. cit., p. 41-42

Millán y Moreno 2005,¹⁶⁹ encontraron al evaluar la producción, calidad nutricional y aceptabilidad relativa de arbóreas a diferentes edades de corte y alturas de rebrote que especies como *Sambucus nigra* fueron de mejor calidad nutricional que especies comúnmente empleadas y reportaron valores de FDN del 35% y FDA del 20% para esta especie.

Cuando los contenidos de FDN y FDA se consideran elevados en determinada especie, se sugiere que la disponibilidad de energía puede ser limitada. Un alto contenido de estos se asocia con un menor consumo de alimento, al ser estos componentes de lenta degradación en el rumen.

Carvajal, menciona que: “desde el punto de vista nutricional la fibra se determina como una fracción heterogénea cuyos componentes son resistentes a la actividad enzimática del tracto gastrointestinal”.¹⁷⁰

Sin embargo los rumiantes gracias a su sistema digestivo tetracompartimentalizado, tienen la habilidad para aprovechar los alimentos fibrosos.

Quirama y Caicedo, citados por Carvajal:¹⁷¹ explican que la presencia de fibra en la fuente alimenticia cualquiera que esta sea y en particular el contenido de lignina afecta la digestibilidad de los nutrientes como materia orgánica, fibra, proteína, aminoácidos, minerales, Energía Digestible (ED), Energía Metabolizable (EM) y Energía Neta (EN). En general, la digestibilidad de los forrajes está inversamente relacionada con su contenido de fibra.

¹⁶⁹ MILLÁN, H. y MORENO, F. 2005. Evaluación agronómica de arbóreas multipropósito en la sabana de Bogotá. Tesis de Zootecnista. , Bogotá D.C. Universidad Nacional de Colombia. 75 p.

¹⁷⁰ CARVAJAL T., Juliana I., Digestibilidad *In vitro* Prececal Y Cecal De Plantas Forrajeras Tropicales Para La Nutrición En Cerdos. Universidad Nacional De Colombia Facultad De Ciencias Agropecuarias. Palmira. 2010.

¹⁷¹ *Ibíd.*

6.4 CONTENIDO DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Se evaluaron un total de 4 grupos de metabolitos: taninos, esteroides, saponinas y alcaloides. Para la descripción de las pruebas se utilizó el sistema cualitativo de cruces para especificar la presencia o ausencia de los grupos de metabolitos, siguiendo los criterios: presencia abundante (+++), presencia moderada (++) , presencia baja (+) y nula (-).

En la tabla 8 se observan los resultados de los metabolitos secundarios presentes en los recursos forrajeros evaluados en la presente investigación.

El contenido de saponinas fue moderado (++) en *Medicago sativa* y abundante (+++) en *Acacia decurrens*, mientras que para los recursos forrajeros restantes su presencia fue de baja (+) a nula (-).

Duncan y Milne¹⁷² señalan a las saponinas como metabolitos secundarios generalmente con efectos negativos en la alimentación animal, pero diversos trabajos reportan sus bondades como sustancias defaunantes a nivel ruminal, o sea para disminuir la cantidad de protozoarios, obteniéndose importantes beneficios nutricionales en cuanto al aprovechamiento de la proteína y la energía principalmente, los que a su vez se asocian a menores tasas de producción de gases y menores proporciones de conversión de residuos a aquellos gases de efecto invernadero como el metano CH₄.

Los taninos se encontraron en una baja proporción (+) en *Otholobium munitense* y *Ambrosia arborescens*, presencia moderada (++) en *Sambucus nigra* y abundante (+++) en *Acacia decurrens*. En los demás tratamientos su presencia fue nula (-).

¹⁷² DUNCAN, A.J. and, MILNE, J.A.. Glucosinolates. Aspects of Applied Biology, Antinutritional factors, potentially toxic substances in plants. s.l.: Institute of Horticultural Research, 1989. p. 75-92

Tabla 8. Contenido de metabolitos secundarios de los recursos forrajeros evaluados

	<i>Alimento base</i>	<i>Lolium multiflorum</i>	<i>Medicago sativa</i>	<i>Phalaris arundinacea</i>	<i>Otholobium munyense</i>	<i>Baccharis latifolia</i>	<i>Abutilon striatum van</i>	<i>Acacia decurrens</i>	<i>Raphanus sativus L</i>	<i>Sambucus nigra</i>	<i>Ambrosia arborescens</i>	<i>Beta vulgaris</i>	
												<i>follaje</i>	<i>fruto</i>
SAPONINAS	-	-	++	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
	+	++	+	++	+	+	+	++	+	++	+	+	+
TANINOS	-	-	-	-	+	-	-	+++	-	++	+	-	-
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
ESTEROLES	+	+	++	++	++	++	+	+++	+	++	+	+	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	-	-	+	+	++	+	-	+	-	+	-	+
ALCALOIDES	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: Laboratorios Especializados Universidad de Nariño, 2011.

Según Lascano *et al*, citado por Valencia¹⁷³: los taninos son polifenoles producidos por las plantas como metabolitos secundarios durante la síntesis de aminoácidos aromáticos a partir del ácido siquímico, con la capacidad de formar complejos con proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, esteroides, alcaloides y saponinas. En general la mayoría de las leguminosas forrajeras contienen altas concentraciones de taninos condensados que producen efectos depresivos sobre el consumo y la digestibilidad de la materia seca y el nitrógeno, como lo reveló esta investigación.

Mera,¹⁷⁴ afirma que los taninos hidrolizables y condensados ligan proteínas, por ello en forrajeras de altos contenidos de taninos y proteína, la degradación de la proteína se reduce debido a su presencia, pues tienen la capacidad de ligar enzimas digestivas las cuales tienen como efecto inhibir su actividad digestiva, o a las proteínas de la dieta, produciendo un complejo tanino – proteína menos digerible.

El mismo autor asegura, que los altos niveles de taninos reducen el nivel de ingestión voluntaria, primero porque pueden disminuir la digestibilidad de la materia seca en el rumen y reaccionar con la mucosa interior del tracto digestivo interfiriendo con la absorción a nivel de pared lo que produce señales de distensión física y la depresión puede ser debida a la palatabilidad. Los taninos de las plantas pueden precipitar proteínas salivares, causando un desagradable sabor astringente en la boca.

En un estudio *In vitro* de Chiquette *et al*, citado por Mera¹⁷⁵; se demostró que en la variedad de *Lotus corniculatus L.* se encuentran taninos condensados de niveles bajos 1 a 3% y altos 4.9 a 5.4%. Evidenciando que en las variedades con concentraciones altas de taninos, hubo menos desaparición de materia seca después de 24 horas.

¹⁷³ VALENCIA TRUJILLO, F.L. Efecto de la mezcla de leguminosas tropicales en relación con la presencia de taninos y emisiones de metano en un sistema *In vitro* (RUSITEC). Tesis de grado presentada para obtener el título de Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en producción animal tropical. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. 2003. 83 p.

¹⁷⁴ MERA ALVAREZ, M.I. Efecto de leguminosas forrajeras tropicales ricas en taninos sobre la fermentación y la producción de metano en un sistema *In vitro* (RUSITEC). Trabajo de grado para optar al título de Zootecnista. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT. Laboratorio de forrajes. 2004. 78 p.

¹⁷⁵ *Ibíd.*

En una investigación realizada por Bernal¹⁷⁶, se encontró que la mayor producción de gas a las 144 horas de incubación, la tasa de producción de gas, las degradabilidades de materia seca y proteína, y la concentración de amonio fue mayor en las leguminosas *Vigna unguiculata* y *Cratylia argentea* respectivamente, las cuales se caracterizan por carecer de taninos condensados, contrario a esto los más bajos registros se encontraron en las especies Taníferas *Calliandra calothyrsus* y *Flemingia macrophyla*. Evidenciando que los recursos forrajeros que contienen cantidades significativas de taninos en su composición, pueden ser una herramienta que permita mejorar la dinámica digestiva a nivel ruminal, logrando un mejor aprovechamiento de las fuentes proteicas y disminuyendo las pérdidas energéticas por emisión de gases.

En cuanto a los esteroides, su contenido fue moderado (++) en *Medicago sativa*, *Phalaris arundinacea*, *Otholobium munitense*, *Baccharis latifolia* y *Sambucus nigra*, y alto (+++) en *Acacia decurrens*. En las demás especies su presencia fue baja (+) y nula en el fruto de *Beta vulgaris*. Alcaloides sólo se encontraron presentes y en bajo nivel (+) en el fruto y en el follaje de *Beta vulgaris*.

En cuanto a la presencia de compuestos como los descritos, Kumar afirma que: "los ruminantes tienen mayor capacidad de degradar o transformar algunos metabolitos secundarios en pocas cantidades mediante la acción de los microorganismos ruminales"¹⁷⁷.

De acuerdo con Facchini¹⁷⁸ 2001, los metabolitos secundarios son compuestos producidos por plantas y microorganismos, cuya función en el metabolismo es aún desconocida. Estos compuestos le sirven a las plantas superiores como metabolitos de defensa al ataque de depredadores o son la respuesta a condiciones ambientales de estrés.

Así, saponinas y taninos poseen características de limitar la capacidad de absorción a nivel del tracto digestivo, y su contenido es mayor en las vainas, frutos

¹⁷⁶ BERNAL B., Laila C. Op. cit., p. 83-84.

¹⁷⁷ KUMAR R. Antinutritional factors. The potential risks of toxicity and the methods to alleviate them. S.I.: Speedy A.W., 1992. p. 145-160.

¹⁷⁸ FACCHINI, P. J. Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., Universidad de Calgary. Alberta Canadá. 2001. 52, 29-66 p.

y semillas de leguminosas forrajeras o plantas con altos contenidos de proteína aunque esto no sea una constante. Lo anterior explica la presencia de estos compuestos en especies como *Acacia decurrens*, *Sambucus nigra*, *Otholobium munyense* y *Ambrosia arborescens*, plantas leguminosas, con contenidos regulares de proteína, de amplia difusión geográfica y susceptibles del ataque de predadores por las características llamativas de sus inflorescencias¹⁷⁹.

Esteroles desempeñan básicamente una función de tipo hormonal, importante a la hora de repeler el ataque de predadores y atraer la presencia de organismos polinizadores. Están presentes en la mayoría de las especies vegetales siendo más abundantes en leguminosas. Alcaloides son compuestos producidos por las plantas con fines alelopáticos ya sea para repeler el ataque de parásitos o el crecimiento de especies competitivas, o para atraer especies con relación simbiótica. Su efecto en el organismo animal puede ser tóxico en la mayoría de los casos. Por lo menos un 10% de los vegetales existentes contienen alguno de estos compuestos siendo amplia la variedad de especies en las que se encuentran¹⁸⁰, como en esta investigación *Beta vulgaris* tanto en hojas como en raíz (fruto) en mínima presencia.

6.5 PERFILES DE PRODUCCION DE GAS DE LAS ESPECIES FORRAJERAS

Producción total de gas

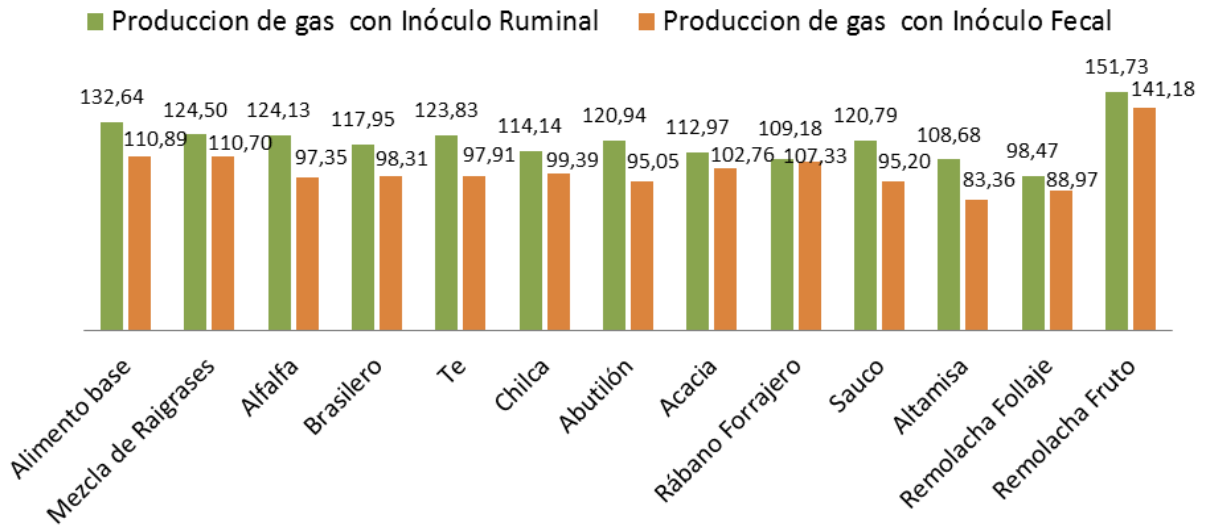
Los resultados obtenidos se muestran en la figura 2. Se encontraron valores de producción de gas entre 98,47 y 151,73 ml en las muestras incubadas con inóculo ruminal y 83,36 y 141,18 ml en aquellas incubadas con inóculo fecal tras las 96 horas de incubación *In vitro*.

El análisis estadístico (Tabla 9) reveló diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con un mismo inóculo, más no existieron diferencias entre inóculos para un mismo tratamiento. Lo anterior indica que las plantas difieren en su potencial de degradación en el tracto gastrointestinal como consecuencia de su composición disímil.

¹⁷⁹ BOTANICAL-ONLINE. Plantas venenosas. [En línea]. 2010. [Citado 20 de agosto de 2011]. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/plantasvenenosas.htm>

¹⁸⁰ *Ibíd.*

Figura 2. Producción total de gas con inóculo ruminal e inóculo fecal (ml/g MS)



Las tasas de mayor producción de gas se presentaron en el tratamiento T₁₂ correspondiente al fruto de *Beta vulgaris*, con los dos tipos de inóculo, en tanto que la menor producción de gas estuvo asociada a T₁₁ follaje de de esta misma planta con inóculo ruminal, y T₁₀ *Ambrosia arborescens* Hill con inóculo fecal.

Valores intermedios se reportaron para T₁ Raigrás (*Lolium sp.*), T₂ Alfalfa (*Medicago sativa*) y T₄ Té (*Otholobium munyense*) con inóculo ruminal y para T₇ Acacia Negra (*Acacia decurrens*), T₅ Chilca (*Baccharis latifolia* H.B.K.) y T₃ Brasileiro (*Phalaris arundinacea*) con inóculo Fecal.

Según lo descrito por Bernal¹⁸¹, aquellas plantas que reportan bajos contenidos de FDN y FDA, presentan abundantes niveles de producción de gas, lo que explica el resultado obtenido para el fruto de *Beta vulgaris*, especie que mostró los niveles más bajos de estos compuestos; entre tanto, bajos tenores de producción de gas se asocian con la presencia de metabolitos secundarios como taninos y saponinas, lo que no coincide con lo encontrado para el follaje de esta misma planta, pues no posee dichos compuestos, pero si para *Ambrosia arborescens* que presentó un bajo nivel de estas sustancias en su estructura, al igual que para

¹⁸¹ BERNAL B. Laila C. Op. cit., p 84-86

Otholobium munyense y *Acacia decurrens* que registraron comportamientos intermedios en la producción de gas.

Tabla 9. Efecto del tratamiento y de la fuente de inóculo en la producción de gas

Tratamiento	Hora	96 horas			
		Ruminal		Fecal	
Alimento base	T0	132,64	bBC*	110,89	bB
Mezcla de raigrases	T1	124,50	bBC	110,70	bB
Alfalfa	T2	124,13	bB	97,35	aA
Brasileiro	T3	117,95	bA	98,31	aA
Te	T4	123,83	aB	97,91	aA
Chilca	T5	114,14	aA	99,39	aA
Abutilón	T6	120,94	aB	95,05	aB
Acacia Negra	T7	112,97	aA	102,76	aA
Rábano Forrajero	T8	109,18	bA	107,33	bA
Sauco	T9	120,79	bBC	95,20	aB
Altamisa	T10	108,68	bA	83,36	aB
Remolacha Follaje	T11	98,47	aA	88,97	aB
Remolacha Fruto	T12	151,73	cC	141,18	cC

*Letras minúsculas diferentes en una misma línea indican diferencia estadística ($p < 0,05$) entre inóculos para un mismo sustrato. Letras mayúsculas en una misma columna indican diferencia estadística ($p < 0,05$) entre sustratos para un mismo inóculo.

Las tasas acumulativas de producción de gas encontradas para todos los forrajes, de acuerdo a su composición química, coinciden con lo encontrado por Machado citado por Giraldo *et al*,¹⁸² quienes reportan que los forrajes con menor contenido de FDN tienen tasas de producción de gas más altas y obtenidas en menor tiempo de fermentación. Ello es debido a que los pastos con mayor valor nutritivo muestran todas las condiciones para una colonización y degradación eficiente por los microorganismos, haciendo que se presente mayor y más rápida fermentación.¹⁸³

¹⁸² GIRALDO, L.A., GUTIÉRREZ, L.A., SÁNCHEZ, J. y BOLIVAR, P. A. Relación entre presión y volumen para el montaje de la técnica *In vitro* de producción de gas en Colombia. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Laboratorio de Biotecnología Ruminal (BIORUM).

¹⁸³ NOGUEIRA J., FONDEVILA M., BARRIOS A. y GONZÁLES, M. *In vitro* microbial fermentation of tropical grasses at an advanced maturity stage. *Animal Feed Science and Technology*. 2000. 83: 145- 157.p

Según Montenegro y Abarca, citados por Carmona *et al*¹⁸⁴ en ensayos realizados en Costa Rica, el Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) presenta una mayor eficiencia en la producción de leche que la Estrella Africana (*Cynodon nlenfuensis*), lo que a su vez motiva una mayor tasa de producción de gas, pero una menor producción de metano, lo que significa mayor aprovechamiento de la energía disponible para producción.

Los mismos autores afirman que para las dos pasturas la producción de metano es mayor a medida que la edad de pastoreo incrementa, debido al aumento en el material lignocelulósico.

Según Giner-Chávez¹⁸⁵ 1996, en la medida que el nivel de taninos condensados solubles aumenta en las muestras de leguminosas, la cantidad de gas producida por unidad de materia seca decrece. Lo que también concuerda con lo reportado por Sanabria *et al*¹⁸⁶, 2006, y lo que se aplica en el caso de las tasas de producción de gas encontradas en este estudio para especies como *Otholobium munyense*, *Acacia decurrens* y *Ambrosia arborescens*, de las que se pudo evidenciar mediante el análisis de metabolitos secundarios la presencia de taninos en su estructura.

Según se describió anteriormente el análisis estadístico ($p < 0,05$) no reveló diferencias significativas en las tasas de producción de gas con diferente inóculo para un mismo tratamiento (Tabla 9), lo que permite concluir que el tipo de inóculo empleado no afectó el crecimiento y desarrollo de la población microbiana del rumen tras su incubación *In vitro*, resultados que según la presente investigación aprueban el uso de fuentes alternativas al inóculo ruminal en el desarrollo de procedimientos similares, lo que se convierte en una alternativa de mayor viabilidad a la hora de efectuar estudios que requieran de población microbiana para simular las condiciones ruminales a nivel de laboratorio.

¹⁸⁴ CARMONA J. C., *et al.* 2005. Op. cit., p. 52.

¹⁸⁵ GINER-CHAVEZ B. I. 1996. Condensed tannis in tropical forages. Ph.D. dissertation. Cornell University. N.Y. USA.

¹⁸⁶ SANABRIA C. P., BARAHONA, MONSALVE, L. M., TIEMANN T.T., LASCANO, HESS H.D., MARTIN MARTINEZ E. y RODRIGUEZ F. Monitoreo de las dinámicas poblacional *In vivo* de los principales grupos de microorganismos ruminales en respuesta a la inclusión de *Vigna unguiculata*, *Flemingia macrophyla* y *Calliandra calothyrsus* en la dieta de ovinos africanos. En: Segundo Taller de Taninos en la Nutrición de Rumiantes en Colombia. Bogotá noviembre 30, diciembre 1 de 2006. p 35-38

Mauricio *et al* citados por Posada y Noguera,¹⁸⁷ reportaron que en experimentos realizadas con el fin de comparar líquido ruminal y heces como fuente de inóculo, con la materia fecal se obtuvieron mayores tiempos de colonización y una menor capacidad de fermentación, lo que posiblemente se deba a una menor actividad microbiana porque los microorganismos son originados principalmente en el ciego y el colon.

Sin embargo, el uso potencial de las heces como fuente alternativa de inóculo evita el empleo de animales fistulados, permitiendo la caracterización de los recursos alimenticios en las condiciones propias de cada producción ganadera, considerándose como una alternativa viable y económica la cual puede ser validada con más investigaciones.

Posada, en una investigación reciente valoró las heces y el líquido ruminal bovino como inóculos para la técnica *In vitro* de producción de gases, donde se utilizaron seis forrajes diferentes: *Gliricidia sepium*, *Panicum maximum*, *Pennisetum clandestinum*, *Lolium multiflorum*, *Morus alba* y *Cynodon nlemfuensis*. Encontrándose que en el análisis de precisión ambos inóculos exhibieron un desempeño similar, si bien con el líquido ruminal se logró mayor homogeneidad en los resultados. El análisis de exactitud permitió concluir que los inóculos no son intercambiables.¹⁸⁸

En cuanto a los perfiles de la producción de gas acumulada, (figura 3) es evidente una diferencia en su dinámica, resultante del efecto de cada tipo de sustrato empleado (tratamientos), en términos de su calidad y contenido nutricional y de otro tipo de componentes que generaron perfiles propios de producción de gas según los efectos de interacción sucedidos a lo largo del proceso de incubación.

Dichos resultados se explican desde la complejidad composicional de cada forraje empleado en este estudio, pues es amplia la variedad escogida, ya que abarca herbáceas, arbóreas y arbustivas tanto de uso convencional como alternativo, gramíneas y leguminosas, incluso tubérculos, sometidas a diversos tipos de manejo agronómico según los requerimientos de cada especie y con

¹⁸⁷ POSADA, Sandra Lucia., NOGUERA, Ricardo. Op. Cit., p. 33-36

¹⁸⁸ POSADA Sandra Lucia. Valoración de las heces y el líquido ruminal como inóculos en la técnica *In vitro* de producción de gases. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín. 2006. 78 p.

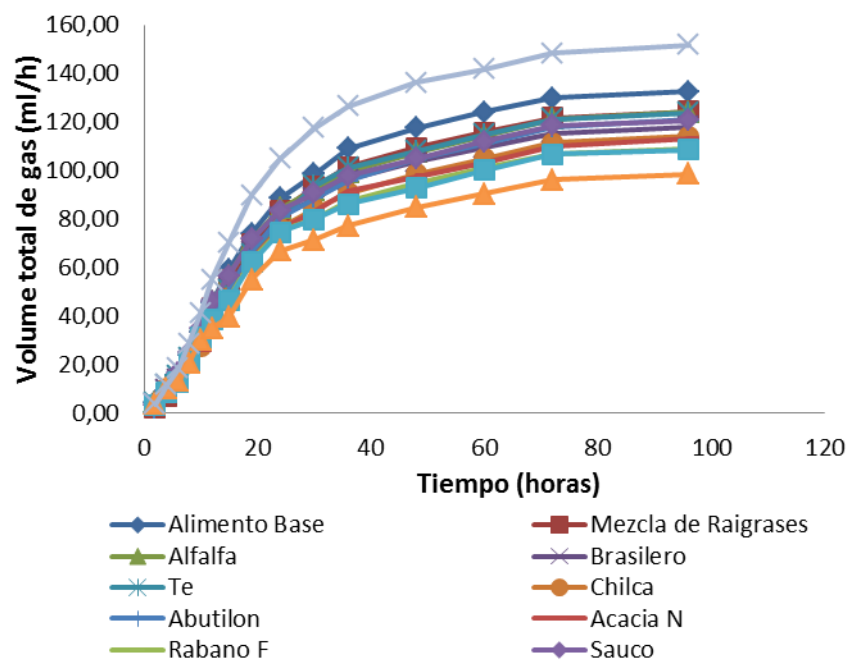
características propias en cuanto a contenido de proteína, fibra y metabolitos secundarios; condiciones que influyen directamente sobre la cinética de digestión de las mismas y que en la mayoría de los casos no coinciden con lo reportado por otras investigaciones.

Los sustratos incubados demostraron una rápida colonización, comportamiento que se evidenció a partir de los valores de producción de gas generados durante las primeras horas de incubación, a su vez que la fase de máxima producción de gas, la que se asocia con mayor capacidad de desdoblamiento de los nutrientes se presentó de forma generalizada alrededor de la hora 36 de incubación manteniéndose constante hasta la hora 72 del proceso, donde inició el descenso paulatino. Este comportamiento según lo reportado por Posada¹⁸⁹ 2006, está asociado con la naturaleza del sustrato, esto es sus características composicionales, donde el fruto de *Beta vulgaris* se distingue como una especie con una rápida cinética de degradación, comportamiento similar con los dos tipos de inóculo.

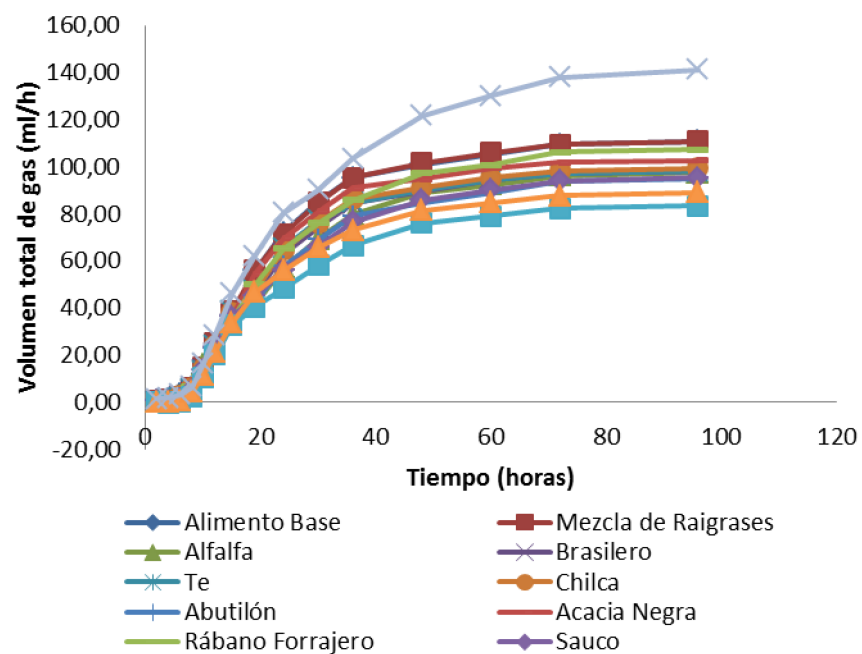
¹⁸⁹ *Ibíd.*

Figura 3. Perfiles de producción de gas acumulado según el tipo de inóculo empleado

Producción de gas con inóculo ruminal



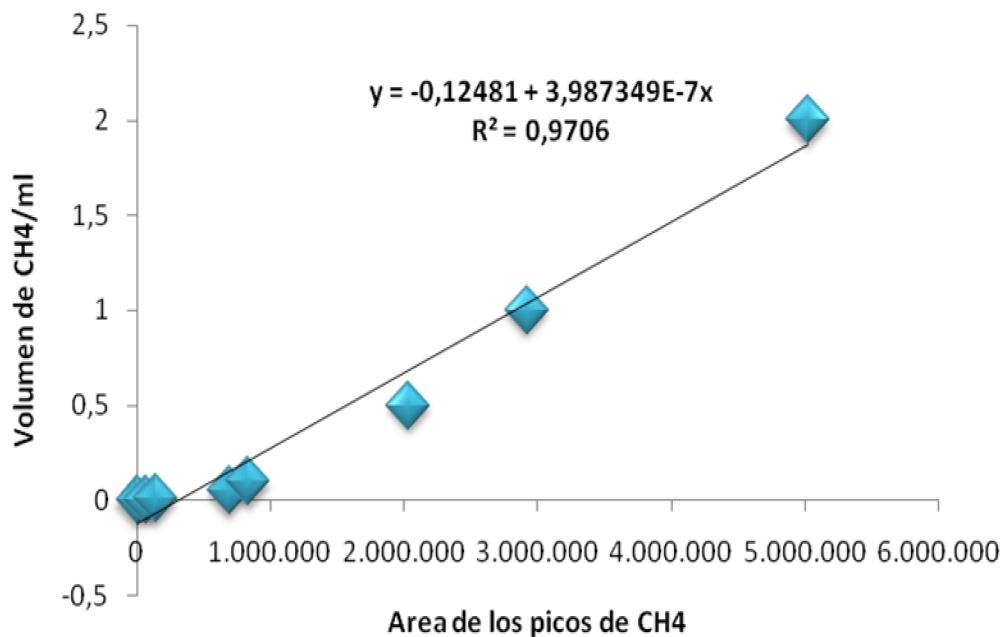
Producción de gas con inóculo fecal



Producción de metano

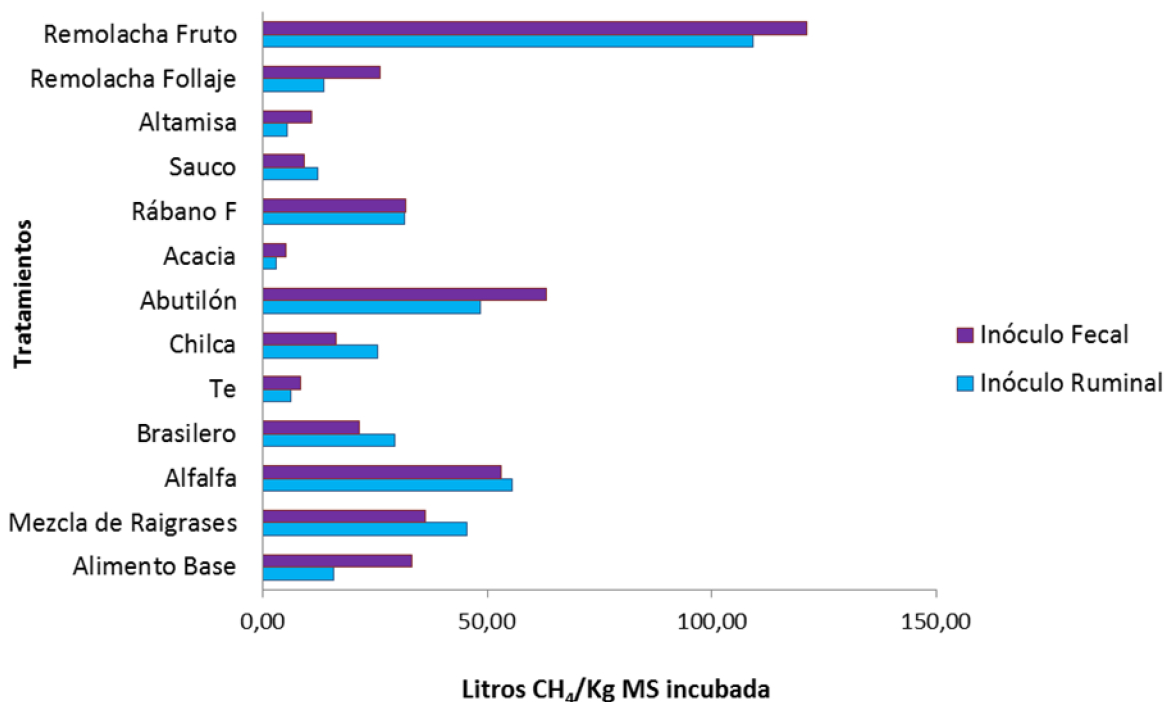
La figura 4 muestra la curva de calibración obtenida para la cuantificación de metano, según un patrón del 90% de concentración.

Figura 4. Curva de calibración de CH₄. Relación volumen/área



La figura 5 muestra los valores de producción de CH₄ obtenidos para cada tratamiento y con las dos fuentes de inóculo empleadas. Los valores más altos se presentaron en el fruto de *Beta vulgaris* T₁₂ (109,23 – 129,10) tanto con inóculo ruminal como fecal, en tanto que los valores más bajos fueron para los tratamientos, T₇ *Acacia decurrens* (3,09–5,08), T₁₀ *Ambrosia arborescens* (5,39–10,84), T₄ *Otholobium munitense* (6,16–8,41) y T₉ *Sambucus nigra* (12,15–9,11), con inóculo ruminal y fecal respectivamente.

Figura 5. Producción de CH₄ por Kg de MS incubada a 96 horas



Los resultados obtenidos permitieron identificar al fruto de *Beta vulgaris* como una especie de elevado potencial en la producción de metano tras su inclusión en la dieta de los bovinos, pues es un tubérculo de la familia Chenopodiáceae, que se caracteriza por un rico contenido en azúcares simples y bajo aporte proteínico, cuyos resultados coinciden con lo reportado por Bernal¹⁹⁰ quien afirma que aquellas dietas de pobre proporción proteínica incrementan los niveles de producción de metano por el desequilibrio generado en la relación de ácidos grasos volátiles, donde hay una producción adicional de H₂ que son aprovechados por bacterias metanogénicas para su transformación en CH₄.

El fruto de *Beta vulgaris* se convierte en una especie que difiere de las características comunes de los recursos forrajeros empleados, pues su contenido de proteína es limitado, pero su aporte energético inmediato es alto, razones que pueden haber modificado la población de microorganismos ruminales, pudiendo elevar las tasas de generación de metano encontradas en este estudio.

¹⁹⁰ BERNAL B. Laila C. Op. cit., p. 13-15

Los bajos valores encontrados para *Acacia decurrens*, *Sambucus nigra*, *Otholobium munitense* y *Ambrosia arborescens*, corroboran la marcada influencia de los taninos en la disminución de la producción de CH₄, pues estas fueron de las únicas especies que registraron presencia de este tipo de metabolitos, con lo cual se explica además los bajos valores de degradabilidad de la materia seca y materia orgánica, al igual que la baja producción total de gas a las 96 horas que se registró para estas especies.

Lo anterior es consecuente con lo descrito por Hess *et al*¹⁹¹ 2003, quien encontró tras emplear taninos condensados aislados a partir de *Calliandra calothyrsus* en dietas experimentales, que las emisiones de metano generadas tras el proceso de fermentación ruminal se vieron notoriamente disminuidas en comparación a aquellas dietas sin inclusión de estos compuestos.

Además según Lascano y Palacios¹⁹² 1993, los taninos tienen la propiedad de formar complejos con proteína a pH neutro y liberarla a pH bajo, por ello se pueden usar para reducir la magnitud de la degradación de proteína soluble en el rumen y de esta forma incrementar la cantidad de flujo de nitrógeno no amoniacal al intestino delgado, disminuyendo la cantidad de H₂ libres en rumen.

De acuerdo con Narváez¹⁹³ 2000, los complejos se forman a pH menores de 3 o mayores de 8, por ello los taninos pueden reducir la solubilidad de la proteína y su degradación en el rumen lográndose así una mayor eficiencia en la utilización del nitrógeno por los rumiantes por un incremento en el flujo de nitrógeno y la absorción de los aminoácidos a nivel del duodeno. Se cree además que la formación del enlace completo tanino-proteína, se lleva a cabo por los enlaces de hidrogeno que forman grupos aminocarboxil e hidroxil.

¹⁹¹ HESS H.D., STURM C.D. y TIEMANN T.T. 2006. Op. cit., p. 27-29

¹⁹² LASCANO C. y PALACIOS E. Intake and digestibility by sheep fed mature grass alone and in combination with two tropical legumes. Tropical Agriculture (Trinidad). 1993. 70:365-358

¹⁹³ NARVÁEZ VASQUEZ N. 2000. Op. cit., p. 150

Presión y volumen

Con los 1800 datos obtenidos, derivados de la fermentación de los trece sustratos en todos los horarios de incubación, se construyó una ecuación de regresión a partir de la relación entre presión y volumen, con la finalidad de establecer las características de presión atmosférica y condiciones ambientales de San Juan de Pasto, y de los laboratorios de Ciencias Pecuarias de la Universidad de Nariño para el desarrollo de la técnica *In vitro* de producción de gases y aplicación a posteriores investigaciones.

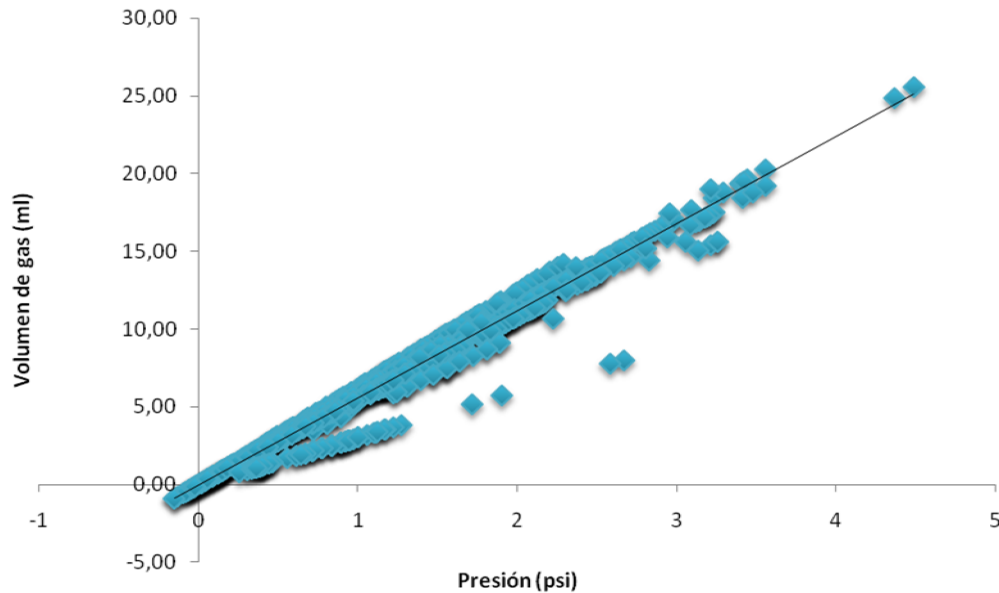
Estos valores permitieron obtener la relación que se muestra en la tabla 10 y en la figura 6. En la misma tabla se presenta la ecuación correspondiente a cada fuente de inóculo, la cual fue construida con la mitad de la información en cada caso. El alto valor del coeficiente de determinación (R^2) obtenido en todas las ecuaciones es un indicador de la capacidad predictiva de las mismas, lo que además avala la aplicación de la técnica y la confiabilidad de los resultados obtenidos.

Tabla 10. Ecuaciones de regresión relacionando presión (psi) (X) y volumen de gas (ml) (Y) obtenidas para el laboratorio de CIENCIAS PECUARIAS UNIVERSIDAD DE NARIÑO, San Juan de Pasto-Nariño

Ecuación de regresión	R^2	CV	Relación presión: volumen
Con las dos fuentes de inóculo			
$Y = -0.06962 + 5.61658X + 0.00306X^2$ P<0,0001	0,97	11,97	5,56
Con inóculo ruminal			
$Y = -0.23707 + 5.78207X + 0.00537X^2$ P<0,0001	0,96	10,40	5,61
Con inóculo fecal			
$Y = -0.02402 + 5.53182X + 0.00479X^2$ P<0,0001	0,97	13,54	5,51

Y = Volumen de gas (ml); X = Presión de gas (psi = libras por pulgada cuadrada)

Figura 6. Relación entre presión y volumen



La relación entre presión y volumen de este trabajo, comparada con las reportadas por otros estudios (Tabla 11), demuestra que la implementación de la técnica *In vitro* de producción de gases requiere de la construcción de una ecuación específica por cada laboratorio, acorde a las condiciones de altitud en que se encuentre.

Tabla 11. Ecuaciones de regresión relacionando presión (psi) (X) y volumen de gas (ml) (Y) en diferentes laboratorios.

Lugar	Altura (msnm)	Ecuación	R2	Relación Presión: Volumen
Reading	66	$Y = 0.18 + 3.69 X + 0.08 X^2$	0.99	1 psi = 3.95 ml
Piracicaba	780	$Y = 0.56 + 3.61 X + 0.18 X^2$	0.98	1 psi = 4.35 ml
Belo Horizonte	836	$Y = -0.004 + 4.43 X + 0.051 X^2$	0.99	1 psi = 4.48 ml
Medellín	1538	$Y = -0.1375 + 5.1385 X + 0.0777 X^2$	0.99	1 psi = 5.08 ml
San Juan de Pasto	2488	$Y = -0.06962 + 5.61658 X + 0.00306 X^2$	0.97	1 psi = 5.56 ml

Lo anterior concuerda con lo obtenido por Posada y Noguera¹⁹⁴ quienes lo explican desde el punto de vista que el aumento en la presión atmosférica no

¹⁹⁴ POSADA, Sandra Lucia, NOGUERA Ricardo. Op. cit., p. 32-24

conserva una relación lineal con el volumen de gas estimado desde las ecuaciones obtenidas, situación que se confirmó en esta investigación.

También es importante anotar que la fuente de inóculo empleada no alteró la capacidad predictiva del volumen de gas a partir de los datos de presión, lo que indica la existencia de una relación directa entre presión y volumen, independientemente del origen del gas, resultado que una vez más corrobora el uso de inóculos alternativos al obtenido de animales fistulados, como en este caso el obtenido a partir de las heces.

6.6 DEGRADACIÓN *In vitro* DE LA MATERIA SECA (MS) Y LA MATERIA ORGÁNICA (MO)

Materia seca

La determinación de degradación de la MS se efectuó a la hora 6 y 96 del proceso de fermentación, cuyos resultados se muestran en la figura 7, en la que se puede observar un comportamiento similar entre fuentes de inóculo, ($p < 0,05$) para un mismo tratamiento con diferente fuente de inóculo, en tanto que si se presentaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para un mismo inóculo como se muestra en la tabla 12.

Los valores más altos de degradación se presentaron en el fruto de *Beta vulgaris* T₁₂, con las dos fuentes de inóculo y en las dos horas evaluadas, con valores de degradación de la MS de 11,92%; 12,25%; 95,32% y 98% para inóculo ruminal y fecal a las 6 y 96 horas respectivamente.

El menor valor de degradación se registró en T₇, forraje de *Acacia decurrens*, con un comportamiento igual en las dos fuentes de inóculo evaluadas. Los valores encontrados fueron de 4,88%; 6,01%; 39,03% y 48,10% para inóculo ruminal y fecal a las 6 y 96 horas respectivamente.

Figura 7. Degradación *In vitro* de la MS

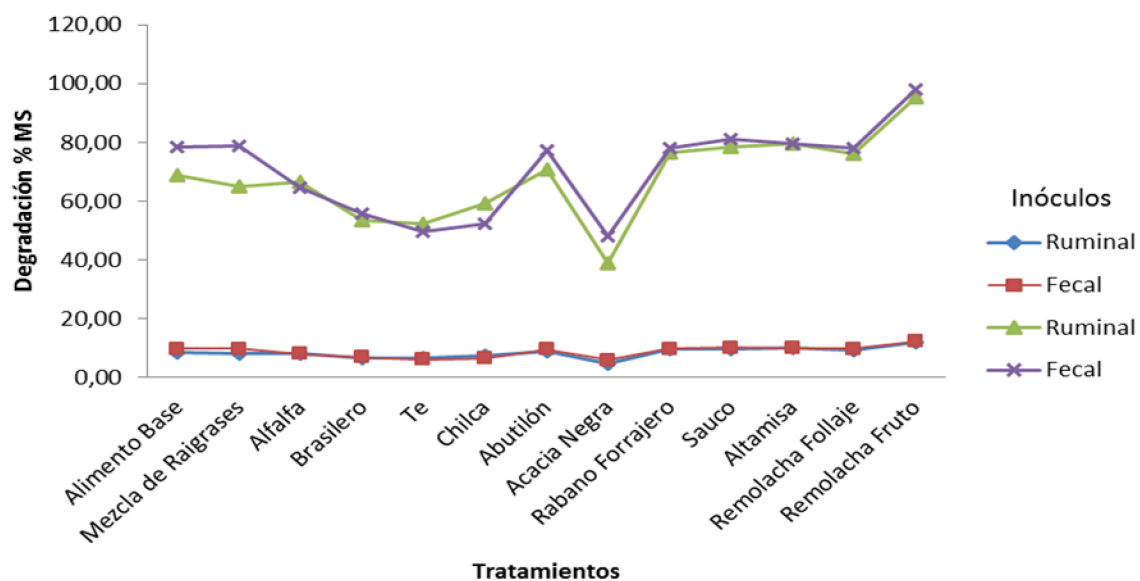


Tabla 12. Efecto del tratamiento y de la fuente de inóculo en la degradación de la materia seca (MS)

		Hora		6		96	
Tratamiento		Ruminal	Fecal	Ruminal	Fecal		
Alimento base	T0	8,59 bB*	9,79 bB	68,79 bB	78,34 bB		
Mezcla Raigrases	T1	8,14 bB	9,86 bB	65,13 bB	78,87 bB		
Alfalfa	T2	8,30 bB	8,05 bB	66,37 bB	64,42 bB		
Brasileiro	T3	6,67 aA	6,95 aA	53,38 aA	55,62 aA		
Te	T4	6,53 aA	6,22 aA	52,28 aA	49,73 aA		
Chilca	T5	7,40 bA	6,56 aA	59,21 aA	52,45 aA		
Abutilón	T6	8,85 bB	9,66 bB	70,82 bB	77,30 bB		
Acacia Negra	T7	4,88 aA	6,01 aA	39,03 aA	48,10 aA		
Rábano Forrajero	T8	9,56 bB	9,75 bB	76,44 bB	77,97 bB		
Sauco	T9	9,80 bB	10,13 cC	78,40 bB	81,07 cC		
Altamisa	T10	9,93 bB	9,93 bB	79,44 bB	79,47 cB		
Remolacha Follaje	T11	9,53 bB	9,74 bB	76,23 bB	77,90 bB		
Remolacha Fruto	T12	11,92 cBC	12,25 cBC	95,32 cBC	98,00 cC		

*Letras minúsculas diferentes en una misma línea indican diferencia estadística ($p < 0,05$) entre inóculos para un mismo sustrato. Letras mayúsculas en una misma columna indican diferencia estadística ($p < 0,05$) entre sustratos para un mismo inóculo.

La degradación de la materia seca observada en el fruto de *Beta vulgaris*, es un reflejo de su bajo contenido de FDN y FDA, como se mencionó anteriormente, y aunque esto no necesariamente concuerda con lo mencionado por Abreu *et al*,¹⁹⁵ quien asocia los valores de degradabilidad de la materia seca con altos contenidos de proteína, puesto que el fruto de *Beta vulgaris*, fue uno de los tratamientos que menor contenido proteico registró en el análisis nutricional.

Los valores también coinciden con las mayores producciones de gas a las 96 horas de incubación y la ausencia de taninos en la especie, resultados que concuerdan con lo encontrado por Bernal¹⁹⁶ para *Vigna unguiculata* y *Cratylia argentea* en un estudio similar.

Los bajos niveles de degradación de la materia seca encontrados para *Acacia decurrens*, se relacionan con su contenido de fibra y proteína pero sobre todo con la abundante presencia de taninos encontrada en esta especie, pues como bien lo mencionan Mueller-Harvey y McAllan,¹⁹⁷ dada su potencialidad de formar complejos con proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, saponinas entre otros, pueden ligar componentes de la pared celular y hacen en gran parte indisponible los nutrientes para los microorganismos. Los valores encontrados para *Acacia decurrens*, coinciden con lo hallado por Narváez¹⁹⁸ en condiciones análogas.

Materia orgánica

La figura 8 muestra los valores de degradación de la materia orgánica encontrados.

El análisis estadístico no reveló diferencias estadísticas ($p < 0,05$) para un mismo tratamiento con diferente fuente de inóculo, en tanto que si se presentaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para un mismo inóculo como se muestra en la tabla 13.

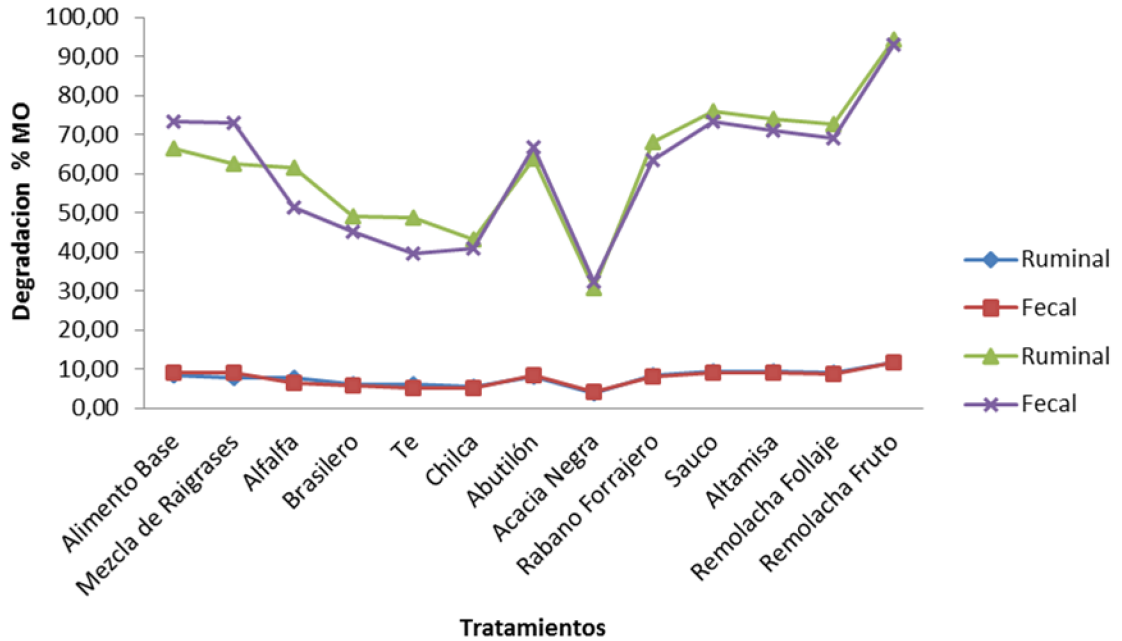
¹⁹⁵ ABREU Andres, *et al*. 2003. Op. cit., p. 21

¹⁹⁶ BERNAL B. Laila C. Op. cit., p 83-84

¹⁹⁷ MUELLER - HARVEY And Mc ALLAN. 1992. Tannins and I their biochemnistry and nutritional propertis. Adv. Plant Cell Biochem. And Biotec. 1. p 151-217.

¹⁹⁸ NARVAEZ VASQUEZ N. 2000. Op. cit., p. 140.

Figura 8. Degradación *In vitro* de la materia orgánica (MO)



Los valores más altos de degradación de la materia orgánica coincidieron con los que se encontraron para la materia seca, es decir fueron para el fruto de *Beta vulgaris* T₁₂, tanto con inóculo ruminal como fecal y en los horarios 6 y 96 de muestreo. Los valores encontrados sin embargo fueron más bajos que aquellos reportados para la materia seca.

Valores bajos de degradación de la MO, estuvieron asociados al forraje de *Acacia decurrens* T₇, resultados que también coincidieron con los encontrados para degradación de la MS siendo más bajos y para la misma especie.

Tabla 13. Efecto del tratamiento y de la fuente de inóculo en la degradación de la materia orgánica (MO)

Tratamiento	Hora	6 horas				96 horas			
		Ruminal		Fecal		Ruminal		Fecal	
Alimento base	T0	8,32	bB*	9,17	bB	66,53	bB	73,36	bB
Mezcla Raigrases	T1	7,83	bA	9,12	bB	62,63	bB	72,99	bB
Alfalfa	T2	7,67	bA	6,43	aA	61,39	bB	51,45	bB
Brasilero	T3	6,12	bA	5,65	aA	48,99	aAB	45,18	aA
Te	T4	6,08	aA	4,95	aA	48,67	aA	39,59	aA
Chilca	T5	5,37	aA	5,09	aA	42,99	aA	40,71	aA
Abutilón	T6	7,96	bB	8,33	bB	63,72	bB	66,64	bB
Acacia Negra	T7	3,85	aA	4,04	aA	30,78	aA	32,34	aA
Rábano Forrajero	T8	8,52	bB	7,95	bA	68,19	bB	63,60	bB
Sauco	T9	9,47	cBC	9,16	bB	75,80	bB	73,32	bB
Altamisa	T10	9,24	bB	8,87	bB	73,91	bB	70,97	bB
Remolacha Follaje	T11	9,10	bB	8,63	bB	72,81	bB	69,06	bB
Remolacha Fruto	T12	11,79	cC	11,64	cC	94,30	cC	93,15	cC

*Letras minúsculas diferentes en una misma línea indican diferencia estadística ($p < 0,05$) entre inóculos para un mismo sustrato. Letras mayúsculas en una misma columna indican diferencia estadística ($p < 0,05$) entre sustratos para un mismo inóculo.

Lo anterior concuerda con lo mencionado por Nieves *et al.*¹⁹⁹ quienes afirman que la digestibilidad de la materia orgánica está determinada por la ausencia de los minerales, ya que su asimilación es reducida por sustancias tóxicas tales como los oxalatos que secuestran el calcio o el magnesio produciendo alteraciones a nivel metabólico, razón por la que es de esperarse que la digestibilidad de la materia orgánica supere a la de la materia seca.

El contenido de materia orgánica del fruto de *Beta vulgaris*, no fue de los valores más altos entre las especies evaluadas, sin embargo presentó el mayor valor de degradación de la MO, lo que una vez más permite comprobar que ésta es una

¹⁹⁹ NIEVES, Duilio, ARAQUE, Humberto, TERAN, Omar *et al.* Digestibilidad de Nutrientes del Follaje de Morera (*Morus alba*) en Conejos de Engorde. *Rev. Cient. (Maracaibo)*. [online]. vol.16, no.4 [citado 02 Agosto 2011], p.315-324. Disponible en internet: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592006000400005&lng=es&nrm=iso>.

especie de elevado contenido de carbohidratos solubles simples, situación que hace más sencillo su aprovechamiento a partir de microorganismos amilolíticos.

Van Soest²⁰⁰, afirma que en los forrajes, la fermentabilidad de la MO es función, principalmente, de la relación carbohidratos no estructurales del contenido celular: carbohidratos de la pared celular; resultando un mayor aprovechamiento de la MO, en aquellas plantas de mayor contenido celular, lo que explica los resultados encontrados en *Beta vulgaris*.

De acuerdo con Bach *et al*²⁰¹, 2005 la síntesis de proteína por los microorganismos del rumen depende de la disponibilidad de nitrógeno (N) y de carbohidratos, entonces: la relación N disponible en el rumen : MO fermentable (NDR : MOF), podría influir en la eficiencia de la síntesis de proteína microbiana, lo que permite explicar los resultados obtenidos en este estudio para el caso del fruto de *Beta vulgaris*, cuya elevada composición de carbohidratos no estructurales produjo altos valores de degradabilidad de la MO, aun cuando el contenido de cenizas de la especie no era de los más bajos, y lo que concuerda con las altas tasas acumulativas de producción de gas encontradas para la especie.

Los resultados obtenidos en *Acacia decurrens* también se explican desde este punto de vista, pues al ser una planta que posee un alto contenido de fenoles en forma de taninos en su estructura, los que limitan el aprovechamiento del nitrógeno a fin de que la microbiota ruminal sintetice proteína microbiana, hacen que la tasa de degradación de los componentes no fibrosos contenidos en esta, se vea disminuida al igual que la producción de gas, y la fermentabilidad de la materia orgánica se limita debida a estos factores.

6.7 PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁLITES (AGV's)

Las curvas de calibración empleadas en la determinación de ácidos grasos volátiles primarios (Acético, Propiónico y Butírico) con sus respectivas ecuaciones se muestra en las figuras 9, 10 y 11.

²⁰⁰ VAN SOEST, P, J. 1994. Op. cit., p. 42

²⁰¹ BACH, A., S. CALSAMIGLIA and M.D STEERN. Nitrogen metabolism in the rumen. 2005. J.Dairy Sci. 88 (E. Suppl.): E9-E21.

Los valores de producción de ácido Acético, Propiónico y Butírico de cada tratamiento, al igual que la producción total de AGV's, con los dos tipos de inóculo se muestran en las gráficas 12,13, y 14.

La mayor producción de Ácido Acético se obtuvo en T₆ *Abutilón striatum van* (980,67 ml/L) y en T₁₂ fruto de *Beta vulgaris* (743,50 ml/L) con inóculo ruminal y fecal respectivamente, con la diferencia de que con inóculo ruminal la mayor proporción de Acetato fue para *Abutilon striatum van* y con inóculo fecal fue para *Beta vulgaris*.

Menores valores se encontraron en T₁₀ *Ambrosia arborescens* (12,89 ml/L), T₇ *Acacia decurrens* (28,69 ml/L), T₁ *Lolium multiflorum* (32,33 ml/L) y T₄ *Otholobium munyense* (34,68 ml/L)

Figura 9. Curva de calibración Ácido Acético

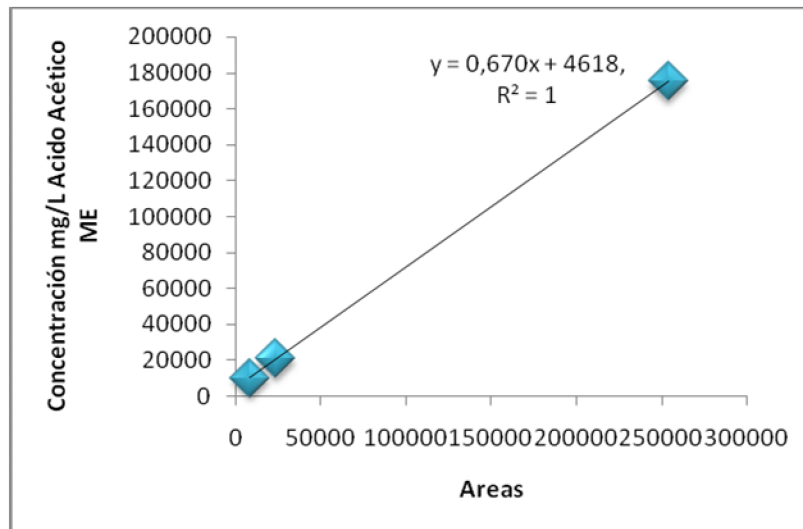


Figura 10. Curva de calibración Ácido Propiónico

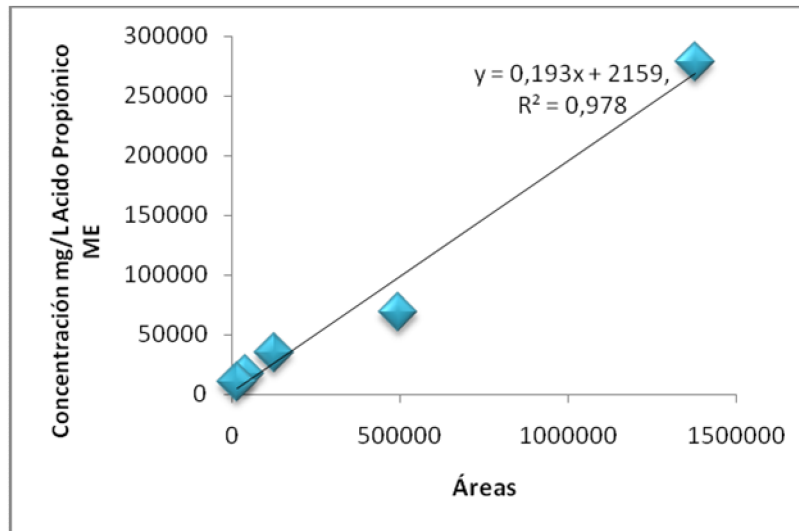


Figura 11. Curva de calibración Ácido Butírico

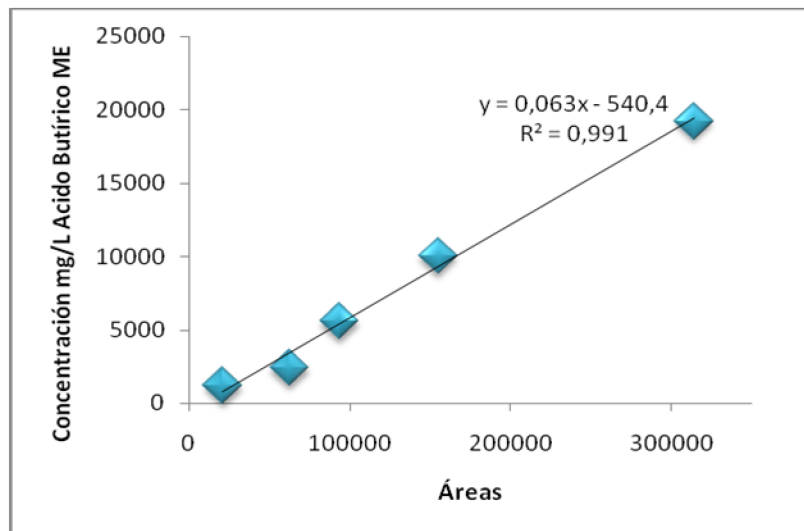


Figura 12. Producción de AGV's con inóculo ruminal

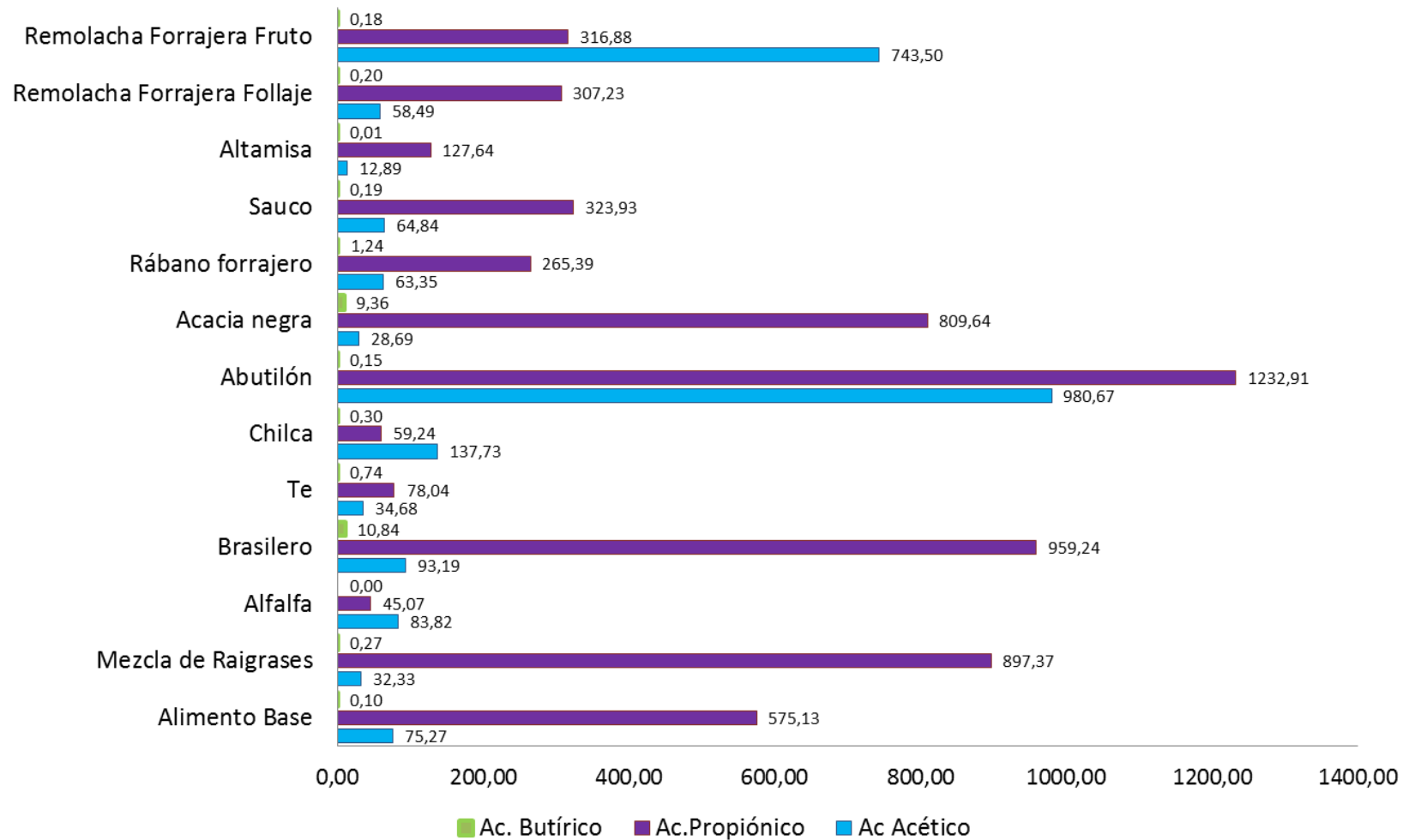


Figura 13. Producción de AGV's con inóculo fecal

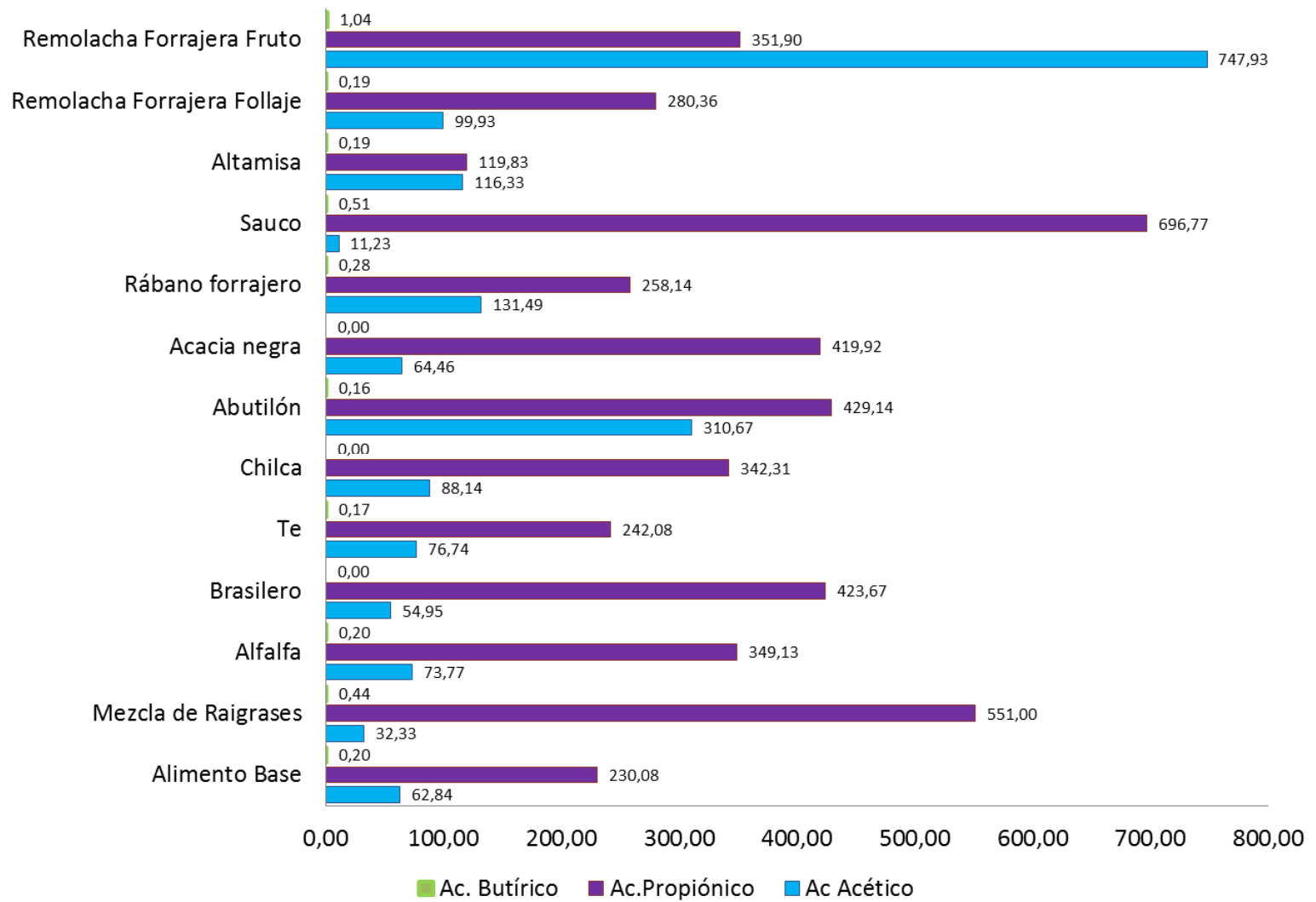
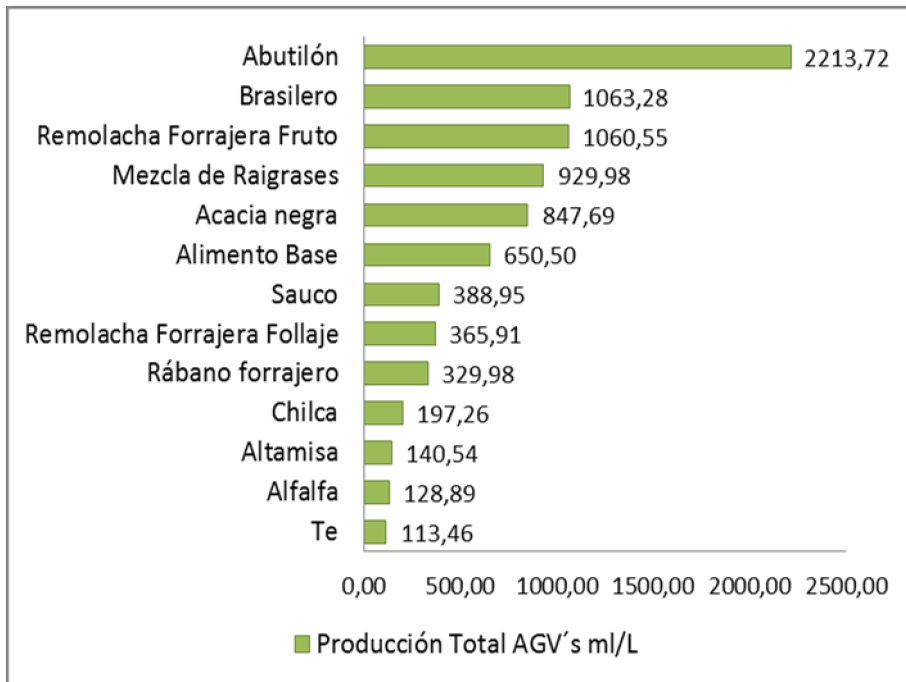
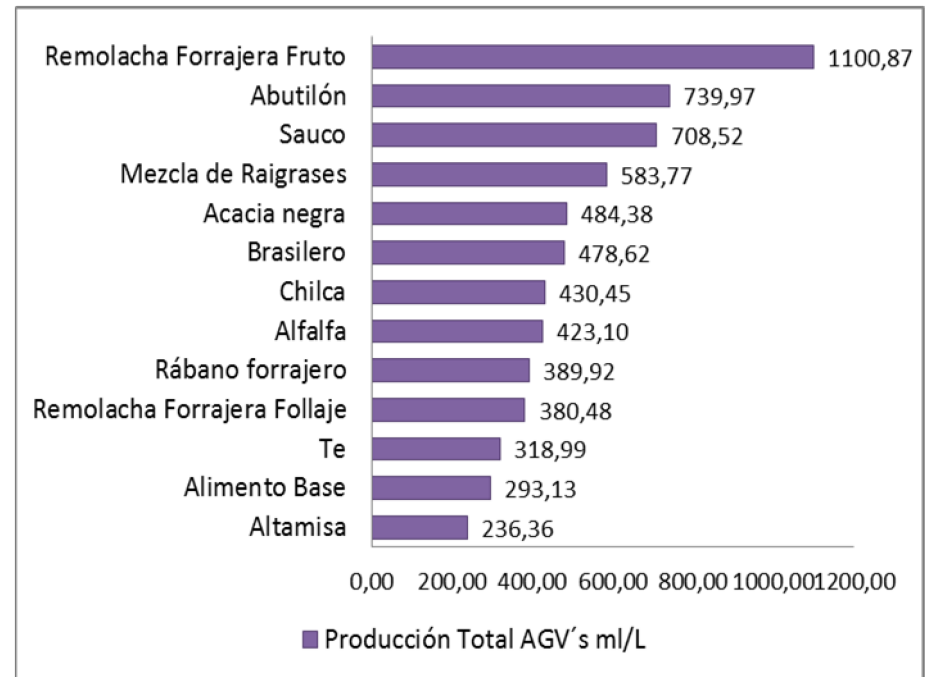


Figura 14. Producción total de AGV's ml/L

Inóculo ruminal



Inóculo fecal



Con respecto al Ácido Propiónico los mayores valores de concentración fueron para T₆ *Abutilón striatum van* (1232,91 ml/L), T₃ *Phalaris arundinacea* (959,24 ml/L) con inóculo ruminal y para T₉ *Sambucus nigra* (696,77 ml/L) y T₁ *Lolium multiflorum* (551,0 ml/L) con inóculo fecal.

Los valores menores fueron para T₂ *Medicago sativa* (45,07 ml/L), y T₅ *Baccharis latifolia* (59,24 ml/L), con inóculo ruminal, y para T₁₀ *Ambrosia arborescens* (119,83 ml/L) y T₀ Alimento base (230,08 ml/L), con inóculo fecal.

En el caso del Ácido Butírico los resultados encontrados representan valores que oscilan entre 0,01 ml/L y 10,84 ml/L, valores que son relativamente pequeños en comparación a los encontrados de los otros dos tipos de ácidos grasos.

En 12 de las 13 especies evaluadas la mayor proporción de ácidos grasos fue de propionato, excepto en el fruto de *Beta vulgaris* incubado con los dos tipos de inóculo, en el cual la mayor proporción de ácido graso presentada fue de acetato.

Los resultados se relacionan con los contenidos de FDN Y FDA antes descritos para las especies evaluadas, pues según Álvarez²⁰², la mayor producción de ácidos grasos es la proveniente de las fracciones de fibra de los alimentos, componentes que incrementan la producción de acetato como lo demuestran los resultados en *Abutilon striatum van* y *Phalaris arundinacea*, plantas con alto contenido de carbohidratos estructurales en su composición. Sin embargo dichas afirmaciones no coinciden con lo encontrado para *Beta vulgaris*.

La baja producción de acetato encontrada en *Ambrosia arborescens*, *Otholobium munyense*, *Sambucus nigra* y *Acacia decurrens*, se explica desde su contenido de taninos, cuya función principal es como se ha descrito anteriormente, la de formar complejos con las proteínas evitando su degradación y por ende la producción de acetato y la consecuente producción de metano a partir de los hidrógenos libres.

²⁰² ALVAREZ N., Diana. M. Op. Cit., p. 65-67

De acuerdo con Ku Vera *et al*²⁰³, La proporción molar de los ácidos grasos volátiles en el líquido ruminal representa un indicador del tipo de sustrato energético (C2, C3 o C4) que estará disponible a nivel metabólico para las funciones de mantenimiento y síntesis (proteína, grasa) en el animal. En raciones basadas en forrajes tiende a predominar un nivel alto de ácido Acético en el líquido ruminal, mientras que en raciones con niveles altos de granos la proporción molar del ácido Propiónico tiende a elevarse, sin embargo, a pesar de que 12 de los 13 tratamientos evaluados corresponden a especies forrajeras, el comportamiento de producción de AGV's no coincide con lo reportado por estos autores ya que las mayores concentraciones fueron de propionato.

Según lo reportado por Wolin²⁰⁴ 1960 y Hungate²⁰⁵ 1966, de las reacciones más importantes que se dan en la fermentación de los carbohidratos se puede concluir que la cantidad de gas producido depende de la cantidad de hexosas fermentadas, y la proporción molar de los diferentes AGV producidos. Cambios en el patrón de fermentación que incrementen la proporción de ácido butírico y acético y disminuya la proporción de Propiónico, pueden resultar en un incremento en el volumen de gas, lo que evidentemente coincide con los resultados encontrados para el caso de *Beta vulgaris*, que según se describió anteriormente fue el tratamiento que mayor tasa de producción de gas acumulada presentó tras la incubación con los dos tipos de inóculo evaluados, además de la alta producción de acetato generada a partir del proceso de su incubación.

Como reporta Bondi²⁰⁶, 1989 el cambio en los porcentajes de estos ácidos no es un suceso eventual sino el resultado final de un complicado ajuste de la biomasa en el rumen, y precisamente esta afirmación permite explicar las variaciones encontradas según el tipo de inóculo empleado.

El mismo autor describe que un cambio dramático en la dieta tiene un marcado impacto en el número y tipo de microorganismos presentes en el rumen. Por

²⁰³ KU VERA, J.C., RAMÍREZ, AVILÉS, L., JIMÉNEZ FERRER, J.A. ALAYÓN Y L. RAMÍREZ CANCINO, H.C. Árboles y arbustos para la producción animal en el trópico Mexicano. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán. 2008

²⁰⁴ HUNGATE, R E. 1966. Op. cit., p. 521.

²⁰⁵ WOLIN, M.J. A theoretical rumen fermentation balance. En: Journal of. Dairy Science. 2000. 43: p 1452-1459.

²⁰⁶ BONDI, A., A. Nutrición Animal en Rumiantes y Monogástricos. Editorial Acribia Zaragoza-España. 1989.

ejemplo: un alto suministro de concentrados (ricos en almidón) en la ración conduce a una alta producción de ácidos orgánicos, disminuyendo el pH ruminal que es propicio para el desarrollo de una flora bacteriana predominante amilolítica, incrementando la producción de ácido Propiónico en el rumen y una relación molar acético = propiónico relativamente estrecha (cerca de 2=1).

Las raciones ricas en forrajes dependen del desarrollo de microorganismos celulolíticos que requieren un pH cercano al neutro (6,0-7,0). Existe una mayor producción de ácido Acético y bajo en ácido Propiónico, originando una relación ácido Acético- Propiónico más amplia (cerca de 3:1).

Para el caso de esta investigación se calculó la relación Acetato:Propionato y los valores obtenidos tanto en el caso de inóculo ruminal como fecal se muestran en las figuras 15 y 16.

La relación más amplia se obtuvo para el fruto de T₁₂ *Beta vulgaris* (2,35 – 2,13) con los dos inóculos, seguida de T₅ *Baccharis latifolia* (2,33) y T₂ *Medicago sativa* (1,86) con inóculo ruminal, y T₁₀ *Ambrosia arborescens* (0,97) y T₆ *Abutilon striatum van* (0,72) con inóculo fecal.

La relación más estrecha fue para T₇ *Acacia decurrens* (0,04) con inóculo ruminal y para T₉ *Sambucus nigra* (0,02) con inóculo fecal.

Los carbohidratos fibrosos producen una alta relación acetato:propionato lo que explica el comportamiento de *Baccharis latifolia* y *Abutilon striatum van* y *Ambrosia arborescens*, cuyos contenidos de FDN y FDA fueron relativamente altos. Las bajas relaciones de *Acacia decurrens* y *Sambucus nigra*, se explican desde sus bajos contenidos de fibra y la presencia de taninos.

Figura 15. Relación molar Acetato:Propionato con Inóculo Ruminal

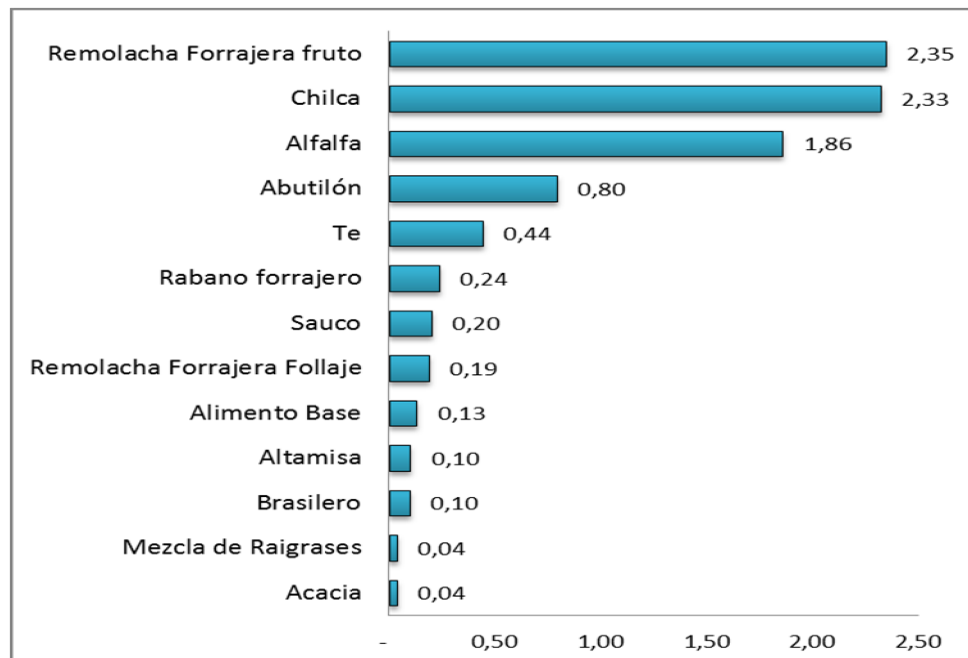
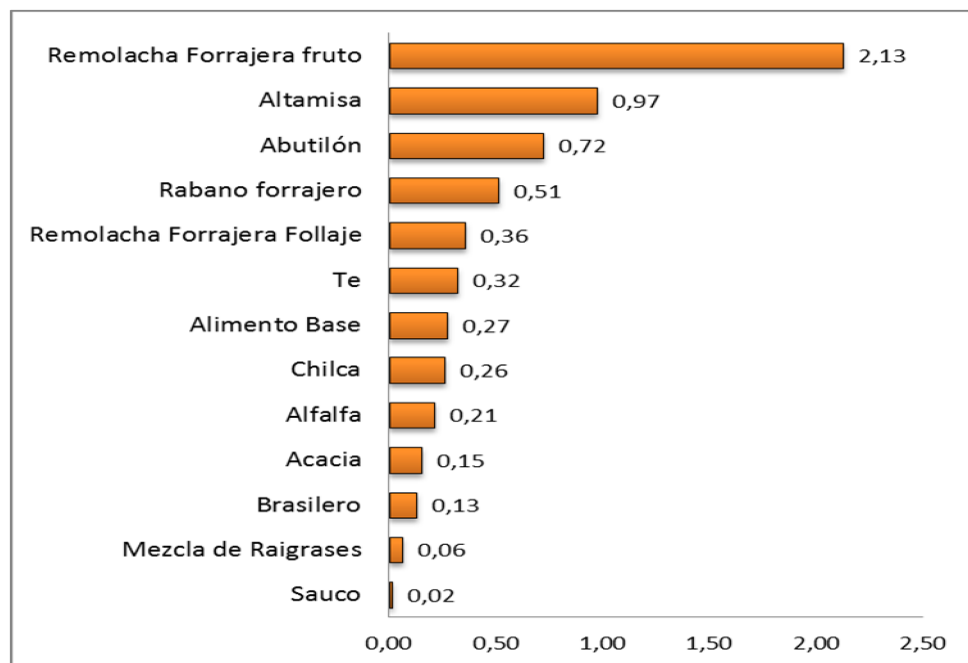


Figura 16. Relación molar Acetato:Propionato con Inóculo Fecal



Según Williams²⁰⁷ 2000, La formación de ácido Propiónico es la única reacción que requiere de H₂; por lo que cualquier remanente de H₂ es usualmente convertido a CH₄. Igualmente, la producción de propionato no involucra la generación de CO₂. De allí que aquellas especies que presentan altas relaciones de acetato-propionato, se caracterizan por poseer un elevado potencial de producción de metano, pues según lo expresado por Blümmel *et al*²⁰⁸, 1997 y Makkar²⁰⁹ 2001, la cantidad y la proporción molar de acetato (a), propionato (p) y butirato (b) determina las moles de CO₂ y CH₄ producidas.

La estequiometría de Wolin²¹⁰ 1960, asume que el balance de oxidación neta de todos los productos es igual a cero ($a+p+b+CO_2+CH_4=0$), que el CO₂ y el CH₄ son producidos únicamente desde el acetato y el butirato y que relativamente al acetato, el doble de la cantidad de CO₂ y CH₄ es generada desde la formación de butirato ($CO_2+CH_4=a+2b$), razón por la cual y con base en esta investigación, el fruto de *Beta vulgaris* puede ser considerado como un recurso de elevado potencial de metano tras su inclusión en la dieta de rumiantes.

Finalmente y según Cruz y Sánchez²¹¹ 2008, los procesos de fermentación ruminal deben producir los ácidos grasos en cantidades y proporciones adecuadas, lo cual se logra mediante el balance de las dietas por su contenido y calidad de carbohidratos. La cantidad y relación de los ácidos grasos volátiles pueden alterar el metabolismo y distribución de nutrimentos. Si la producción de ácido acético se ve disminuida con respecto al ácido Propiónico, la producción de grasa se verá deprimida, mientras que si ocurre lo contrario la producción de glucosa se reduce, influyendo negativamente sobre el volumen de producción.

²⁰⁷ WILLIAMS 2000. Óp. cit., p. 110

²⁰⁸ BLUMMEL, M.; BECKER, K. 1997. Op. cit., p. 757-768.

²⁰⁹ MAKKAR, Harinder. Recent advances in vitro gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. 2003

²¹⁰ WOLIN, M.J. A Op. cit., 2000. p 1452-1459.

²¹¹ CRUZ, M.; SANCHEZ, J. La fibra en la alimentación del Ganado lechero. Centro de investigaciones en nutrición animal (CINA). Universidad de Costa Rica. San Jose, Costa Rica. 2008. [En línea] [Citado 09 de agosto de 2011]. Disponible en: <http://www.feednet.urc.ac.cr/bromatologia/bfagl.htm>.

6.8 ESQUEMAS NUTRICIONALES RECOMENDADOS PARA AMINORAR LAS PÉRDIDAS ENERGÉTICAS EN FORMA DE EMISIONES DE CH₄ EN BOVINOS DE TROPICO DE ALTURA

La fisiología digestiva de los rumiantes permite el aprovechamiento de materiales fibrosos para la obtención de productos alimenticios de alto valor nutritivo, entre ellos carne y leche. Sin embargo la generación de metano es un procedimiento normal de la función digestiva de los animales. Estos procesos de fermentación microbiana originan metano como producto de eliminación, que es exhalado o eructado por el animal. La cantidad producida y excretada por un rumiante depende principalmente de las características del sistema digestivo y de la cantidad y calidad del alimento consumido.²¹²

Las pérdidas energéticas en la producción de metano por los rumiantes significan entre un 2 y un 12% de la energía bruta incorporada en su alimento. El Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC),²¹³ estima una pérdida del 6% de la energía bruta ingerida para ganado en pastoreo en forma de CH₄ y del 3,5 % para ganado en confinamiento.

Tomando como base los resultados obtenidos en esta investigación es posible sugerir en un comienzo la incorporación de especies como *Acacia decurrens*, *Sambucus nigra*, *Otholobium munitense* y *Ambrosia arborescens* a través de arreglos silvopastoriles o multi-estrato como un complemento de las dietas convencionales, con miras a que tras su inclusión se puedan aminorar las emisiones de metano y a la vez las pérdidas energéticas por parte de los bovinos lecheros, aprovechando los servicios ambientales que ofrece el establecimiento de árboles y arbustos en las praderas destinadas al pastoreo.

Sin embargo resulta subjetivo entrar a recomendar dietas con niveles determinados de inclusión de las especies antes mencionadas, puesto que estas se han evaluado de forma individual y por ello se desconoce su comportamiento a nivel ruminal al interactuar con otros componentes de la dieta, lo que supone la necesidad de nuevas investigaciones que mediante el uso de la técnica *In vitro* de

²¹² FERNÁNDEZ CIRELLI, Alicia. Vacas peligrosas. En: Encrucijadas #41. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. FVET, UBA. [Citado 30 de Agosto de 2011]. Disponible en < <http://www.uba.ar/encrucijadas/41/contacto/index.php> >

²¹³ IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change: "Revised IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories", Workbook, vol. 2, Module 4, Agriculture. 1996.

producción de gases, evalúen la inclusión de estas arbóreas y arbustivas y con ello determinen tanto el potencial de disminución de las emisiones de metano, como el equilibrio necesario para obtener resultados productivos eficientes sin descuidar el criterio de sostenibilidad y cuidado ambiental.

6.9 ESTRATEGIAS DE MANEJO NUTRICIONAL PARA MITIGAR LAS EMISIONES DE GEI

6.9.1 Control de la Metanogénesis Ruminal. Desde hace un tiempo se han venido desarrollado estrategias que buscan inhibir o controlar de alguna manera la metanogénesis ruminal. Bandyopadhyay *et al*, citados por Sosa *et al*,²¹⁴ indican que dentro de las más utilizadas están: el incremento del consumo por parte del animal, la modificación en la composición de la dieta, la eliminación de los protozoarios y mejoras en la eficiencia de la digestión de la fibra. Sin embargo numerosos agentes químicos también son capaces de inhibir la producción de metano y se han probado como aditivos alimenticios potenciales en las dietas para rumiantes. Estos incluyen análogos halogenados de metano, antibióticos ionóforos, ácidos grasos insaturados, ácido fumárico y otros compuestos que tienen efectos directos o indirectos sobre la metanogénesis ruminal.

6.9.2 Manipulación de la fermentación Ruminal

6.9.2.1 Adición de lípidos. Johnson y Johnson citados por Carmona *et al*,²¹⁵ señalan que la grasa en la dieta de los rumiantes afecta la producción de metano por diversos mecanismos, incluyendo la biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados, el aumento en la producción de ácido propiónico y la inhibición de protozoos. Sin embargo Nagaraja *et al*,²¹⁶ demostraron que la disminución de metano causada por la alimentación con aceites también ocurre en animales defaunados, lo que indica que la eliminación de metanógenos asociados con protozoos no es la principal causa de la inhibición en la producción de metano.

²¹⁴ SOSA, A., GALINDO, J., BOCOURT, R. Metanogénesis ruminal: aspectos generales y manipulación para su control Revista Cubana de Ciencia Agrícola, vol. 41, núm. 2, 2007, pp. 105-114 Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba.

²¹⁵ CARMONA J. C., *et al*. 2005. Op. cit., p. 22

²¹⁶ NAGARAJA, T.G., NEWBOLD, C.J., Van NEVEL, C.J. y DEMEYER, D.I. Manipulation of ruminal fermentation. En: The Rumen Microbial Ecosystem. Hobson, P.N. & Stewart, C.S. Eds. Blackie Academic & Professional. London. 1997. p. 523.

Se ha demostrado que la adición de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga disminuye la metanogénesis porque se convierte en una alternativa metabólica para el hidrógeno. Sin embargo, la cantidad total de hidrógeno usado en los procesos de biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados endógenos es pequeña (1%) comparado con el que es usado para la reducción de CO₂ a metano (48%), la síntesis de AGV (33%) y la síntesis bacterial (12%). Dohme *et al*, citados por Carmona *et al*²¹⁷ señalan igualmente que dietas con altas cantidades de ácidos grasos de cadena media pueden ser efectivos en la reducción de metano y de las poblaciones protozoales. Una proporción de bacterias metanógenas es endo y ectosimbióticas con los protozoos. Por lo tanto la reducción del número de protozoos aparentemente contribuye a una declinación en la población de metanógenos, además se supone que la toxicidad de algunos ácidos grasos de cadena larga y media sobre las bacterias metanógenas también tienen un gran efecto.²¹⁸

Prins *et al*,²¹⁹ afirman que la toxicidad de estas sustancias para las bacterias metanogénicas aumenta con su grado de insaturación. Se plantea también que los isómeros cis son mucho más activos que los isómeros trans o los ácidos grasos saturados. Los inhibidores de la metanogénesis más efectivos incluyen ácidos grasos como linoleico y ácido cis-oleico y algunos ácidos grasos saturados como behénico y esteárico. Gil, Beauchemin y McGinn, citados por Sosa *et al*²²⁰, demostraron disminuciones significativas de la metanogénesis con aceites de coco, canola. Mohammed *et al*²²¹, con aceite de rábano, McGinn *et al*²²², con girasol y aceites de pescado basados en ácido n-3-eicosapentanoico (EPA) y ácido n-3-docosahexanoico (DHA).

²¹⁷ CARMONA J. C., *et al*. 2005. Op. cit., p. 25

²¹⁸ MOSS AR., *et al*. 2000. Óp. cit., p. 321

²¹⁹ PRINS, R.A., Van NEVEL, C.J. y DEMEYER, D.I. Pure culture studies of inhibitors for methanogenic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.* 1972. 38:281.

²²⁰ SOSA, A. *et al*, 2007. Op. cit., p. 41

²²¹ MOHAMMED, N., AJISAKA, N., LILA, Z.A., KOJI HARA, MIKUNI, K., HARA, K., KANDA, S. and ITABASHI, H. Effect of Japanese horseradish oil on methane production and ruminal fermentation in vitro and in steers. *J. Anim. Sci.* 82:1839. 2004.

²²² Mc GINN, S.M., BEAUCHEMIN, K.A., COATES, T. y COLOMBATTO, D. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *J. Anim. Sci.* 82:3346. 2004.

Sosa *et al*,²²³ reportan que en estudios recientes Ungerfeld *et al*, evaluaron las propiedades antimetanogénicas potenciales de un ácido hexadecatrienoico altamente insaturado, aislado del alga *Chaetoceros* y encontraron que éste disminuía la producción de metano hasta en 97%, pero disminuyó la fermentación y se incrementó la acumulación de hidrógeno. Estos mismos autores estudiaron el efecto del aceite de oliva, como uno de los aceites más importantes producidos en la industria, sin embargo éste no afectó la producción de metano.

6.9.2.2. Adición de ionóforos. Los antibióticos ionóforos son sustancias muy utilizadas en los últimos años en la reducción de las emisiones de metano. Estos compuestos incrementan significativamente la producción de propionato a expensas de la producción de acetato y butirato, y disminuyen la liberación de hidrógeno de ciertos compuestos como el formiato, de esta forma se reduce la producción de metano.

Los ionóforos más empleados son la monensina y el lasalocid, aunque también son objeto de estudio otros como el calcimycin (tipo III), el abierixin (tipo II) y el catiomycin, los dos últimos a pesar de su efecto en la inhibición de la metanogénesis disminuyen la degradación de las fracciones fibrosas.²²⁴

La monensina es un antibiótico polieter carboxílico, producido por *Streptomyces cinnamonesis*. El cual además de disminuir la producción de metano en el rumen, es capaz de incrementar la proporción molar de propionato e inhibir el crecimiento de bacterias metanogénicas, sin afectar la producción de AGVs totales ni la degradación de la MS, Galindo *et al*, citados por Sosa *et al*²²⁵. Otros autores informan además un aumento en la eficiencia de la utilización del alimento, interpretado como un resultado en parte por la reducción de la metanogénesis. La adición de este antibiótico disminuye la población de bacterias celulolíticas en el rumen de los animales, así como la degradabilidad de la materia orgánica, la celulosa y la hemicelulosa.²²⁶

²²³ SOSA, A. *et al*, 2007. Op cit., p. 42

²²⁴ BOGAERT, C., JOUANY, J.P. y JEMINET, G.. Effects of the ionophore antibiotics monensin, monensin-propionate, abierixin and calcimycin on ruminal fermentations in vitro (Rusitec). *Anim. Feed Sci. Tech.* 1990. 28:183.

²²⁵ SOSA, A. *et al*, 2007. Op. cit., p. 43

²²⁶ DONG, Y., BAE, H.D., Mc ALLISTER, T.A., MATHISON, G.W. y CHENG, K.J. Effects of exogenous fibrolytic enzymes, Lbromoethanosulfate and monensín on fermentation in a rumen simulation (RUSITEC) system. *Can. J. Anim. Sci.* 1999. 79:491.

En este sentido Van Soest,²²⁷ señala que los ionóforos no son inhibidores directos de las bacterias metanógenas, sino que restringen la producción de hidrógeno y por ende la formación de metano. Los verdaderos inhibidores incluyen los halógenos – metanos y metil – derivados.

Gil, citado por Sosa *et al*,²²⁸ afirma que la efectividad de estos antibióticos no es de larga duración, posiblemente por aparición de resistencia en las bacterias metanogénicas, lo que obligaría el uso de distintas fuentes de ionóforos.

6.9.3 Composición de la dieta

6.9.3.1 Tipo de carbohidrato. Carmona *et al*,²²⁹ afirman que el principal componente en la producción de metano es el tipo de carbohidrato y la tasa de fermentación. El tipo de carbohidrato fermentado afecta la producción de metano probablemente a través de impactos en el pH y la población microbiana. Así, la fermentación de los carbohidratos fibrosos producen una relación acetato:propionato elevada y una alta producción de metano. Pero dependiendo de la tasa de degradación de la fibra y del consumo relacionado, la producción de metano varia. Este aspecto se evidencia en algunos subproductos de destilería que tienen buena cantidad de fibra, de buena digestibilidad, resultando en disminuciones en la producción de metano.

Moss *et al*,²³⁰ indican que con dietas altas en almidón se favorece la producción de propionato y se disminuye la relación metano/materia orgánica fermentada en el rumen. Evidenciándose, que el efecto de estas dietas sobre el pH ruminal puede explicar la disminución de las emisiones de metano.

Carmona *et al*,²³¹ reportan que la producción de metano (g/día) en ganado alimentado con la gramínea Rodhes (*Chloris gayana*) fue mayor que en animales alimentados con Ángleton (*Dichantium aristatum*) y aun mayor que los alimentados

²²⁷ VAN SOEST P., J. 2005. Op. cit., p. 342

²²⁸ SOSA, A. *et al*, 2007. Op. Cit., p.32

²²⁹ CARMONA J. C., *et al*. 2005. Op cit., p. 30

²³⁰ MOSS AR., *et al*. 2000. Óp. cit., p. 678

²³¹ CARMONA J. C., *et al*. 2005. Op cit., p. 53

con dieta alta en grano. Siendo estos dos tipos de forrajes característicos de zonas tropicales, la producción de metano es mayor y la utilización de la energía menor que lo observado en los forrajes de zonas templadas. Siendo presumible, que la alta producción de metano por forrajes tropicales está relacionada con los altos niveles de fibra y de lignina, los bajos niveles de carbohidratos solubles y a su baja digestibilidad.

6.9.3.2 Procesamiento de los forrajes. Según Carmona *et al*,²³² el picado y peletizado de los forrajes son los factores más preponderantes en el procesamiento de estos, que pueden disminuir significativamente la producción de metano. Posiblemente relacionado con la rápida tasa de pasaje que contribuye a la disminución en la producción de este gas.

6.9.4 Sistemas Silvopastoriles. La combinación de actividades agrícolas, forestales y ganaderas en el mismo espacio no es reciente, campesinos en todo el mundo la han practicado desde tiempos inmemorables, especialmente en regiones tropicales y subtropicales. Actualmente dicha condición interesa cada vez más a otros productores, instituciones y entidades gubernamentales, ya que representa una de las alternativas con mayor viabilidad para superar algunos de los problemas más preocupantes para la humanidad.

En este escenario se acentúa la importancia de los sistemas silvopastoriles, definidos como formas de uso y manejo de los recursos naturales, en los cuales especies leñosas son utilizadas en asociación con cultivos agrícolas o con animales en el mismo terreno, de manera simultánea o en secuencia temporal,²³³ con el fin de beneficiarse de las interacciones ecológicas y económicas que se deducen con vistas a tener un sistema de producción agropecuario sostenible.

Una forma especial de agroforestería pecuaria es la combinación de árboles con pastos y/o animales. Las principales modalidades de sistemas silvopastoriles desarrollados en América latina, los cuales se han extendido y vienen siendo adoptados en nuestro país se describen en la tabla 14.

²³² Ibid.

²³³ MONTAGNINI, F., Sistemas silvopastoriles y mitigación del cambio climático: alternativas para aumentar la captura de Carbono. Yale School of Forestry & Environmental Studies. 2005.

Tabla 14. Principales sistemas agroforestales pecuarios identificados en América Latina.

Sistema de Agroforestería Pecuaria	Atributos	Principales especies utilizadas
Sistemas silvopastoriles con manejo de la sucesión vegetal	Aprovechamiento de un proceso natural. Es el de menor costo financiero.	Muchas especies nativas, o como por ejemplo <i>Psidium guajaba</i> , <i>Prosopis jugiflora</i> , <i>Guazuma ulmifolia</i> , <i>Cordia alliodora</i> , <i>Albizia saman</i> , <i>Acacia decurrens</i> , <i>Alnus acuminata</i> , <i>Thitonia diversifolia</i> , <i>Sambucus nigra</i> .
Arboles dispersos en praderas	Proporcionan sombra, refugio, frutos y follaje para los animales y para la fauna, además de madera.	<i>Pithecellobium dulce</i> , <i>P. longifolium</i> , <i>Inga ssp.</i> , <i>Crescentia cujete</i> , <i>C. alata</i> , <i>Thitonia diversifolia</i> .
Pastoreo de animales en plantaciones forestales	Utilización de bovinos, ovinos y equinos para el control de arvenses y plantas invasoras de los cultivos forestales durante los primeros años.	Plantaciones de <i>Eucalyptus spp</i> , <i>Acacia spp</i> , <i>Pinus spp</i> , <i>Tabebuia sp.</i> , <i>Tectona grandis</i> .
Pastoreo de animales en callejones de árboles o arbustos	Los árboles y arbustos mejoran el reciclaje de nutrientes, previenen la erosión y reducen los efectos del pisoteo animal sobre el suelo.	<i>Gliciridia sepium</i> , <i>Thitonia diversifolia</i> , <i>Acacia magnum</i> , <i>Acacia decurrens</i> , <i>Sambucus nigra</i> .
Sistema silvopastoril intensivo con alta densidad arbustiva para ramoneo directo	Alta productividad de biomasa sin insumos ni agroquímicos. Densidad de 10.000 arbustos por ha, alta productividad animal en carne y leche.	<i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Cratylia argétea</i> , <i>Thitonia diversifolia</i> , <i>Sambucus nigra</i> , <i>Otholobium muniense</i> .
Cercas vivas	Facilitan la conectividad de los paisajes ganaderos. Si son de varios estratos contribuyen a la conservación de la biodiversidad.	<i>Gliciridia sepium</i> , <i>Bursera simaruba</i> , <i>ficus spp.</i> , <i>Pochota quinata</i> , <i>Spondias mombin</i> .
Cortinas o barreras rompevientos	Reducen el efecto negativo de los vientos sobre los animales y en los pastos. Atenúan el impacto de los vendavales o efectos de naturaleza similar.	Muchas especies en varios estratos; <i>Eucalyptus spp</i> , <i>Manguifera indica</i> , <i>Attalea butyracea</i> , <i>Swinglia glutinosa</i> , <i>Sambucus peruviana</i> .
Sistemas de corte y acarreo, Bancos forrajeros mixtos	Son sistemas ideales para la conservación de suelos frágiles de laderas y ecosistemas húmedos. Muy usados en producción campesina y lechería.	<i>Morus alba</i> , <i>Gliciridia sepium</i> , <i>Trichantera gigantea</i> , <i>Thitonia diversifolia</i> , <i>Boehremia nivea</i> , <i>Urera Caracasana</i> , <i>Xanthosoma saggitifolium</i> , <i>Sambucus nigra</i> , <i>Otholobium muniense</i> .

Fuente: MURGUEITIO 2005.

En investigaciones recientes, desarrolladas en los departamentos de Antioquia y Cundinamarca, Calle Díaz *et al*²³⁴ reportan que las barreras vivas de *Sambucus nigra* se pueden combinar con árboles y arbustos. Estableciendo sistemas silvopastoriles multiestratos, donde el estrato alto se conforma por eucalipto (*Eucalyptus grandis*) y (*Eucalyptus globulus*), aliso (*Alnus acuminata*), acacias (*Acacia decurrens*) y (*Acacia melanoxylon*) y sauces (*Salix humboldtii*), donde el estrato bajo se compone de Sauco (*Sambucus nigra*) y botón de oro (*Thitonia diversifolia*) intercalados a una distancia de siembra de 50 centímetros, obteniéndose excelentes rendimientos tanto productivos como de calidad de leche y mejoras en la composición nutricional de las pasturas, generalmente de gramíneas.

6.8.5 Extractos de Plantas. Los extractos de plantas son metabolitos secundarios que pueden aportar alternativas al uso de antibióticos en la alimentación animal.²³⁵ Muchos de estos extractos tienen la capacidad de modificar la actividad microbiana, pero la evidencia sobre sus efectos en la fermentación ruminal es limitada. La actividad antimicrobiana de los extractos de plantas se atribuye al contenido de una serie de metabolitos secundarios que incluyen, entre otros, a las saponinas, taninos y aceites esenciales (principalmente terpenoides y fenilpropanoides).

6.8.5.1 Saponinas y sarsaponinas. Las saponinas y sarsaponinas son los componentes principales de varios extractos de plantas. El efecto del extracto de yuca sobre la fermentación ruminal ha sido uno de los más estudiados, el cual contiene dos compuestos activos principales. La sarsaponina esteroidal, la cual puede secuestrar físicamente el N amoniacal cuando su concentración ruminal es elevada y liberarlo cuando su concentración se reduce. Sin embargo, Wu *et al*, citados por Calsamiglia *et al*,²³⁶ determinaron que a dosis de 6 – 8 g/d la cantidad de N secuestrado por las sarsaponinas era pequeña (solo 34 µg de N amoniacal a un 90% de saturación). En consecuencia, parece que el efecto principal del extracto de yuca sobre el N amoniacal se atribuye a la fracción de saponinas presente en esta.

²³⁴ CALLE DÍAZ, Z., NARANJO, J.F., y MURGUEITIO R., E. El tilo: puerta de entrada a los silvopastoriles en el trópico alto. En Carta Fedegán No. 110. 2010.

²³⁵ CALSAMIGLIA, S., CASTILLEJOS, L. y BUSQUET, M. Federación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal – FEDNA. Estrategias nutricionales para modificar la fermentación ruminal en vacuno. Madrid, 2005. 171 p.

²³⁶ *Ibid.*

Wallace *et al*,²³⁷ mencionan que las saponinas tienen actividad antiprotozoaria, se unen al colesterol y otros esteroides de la membrana celular de los protozoos causando su inestabilidad, lisis y muerte celular. Los protozoos utilizan a las bacterias como su fuente principal de proteína. Cuando se produce una defaunación se reduce el reciclado intra-rumen de N bacteriano, disminuye la concentración de N amoniacal y aumenta el flujo de proteína microbiana.

6.8.5.2 Plantas Taníferas. La deficiencia de proteínas en la dieta de los rumiantes es una de las principales causas de la baja producción ganadera en el trópico. Uno de los muchos objetivos que se persiguen en la formulación de sistemas de alimentación eficientes, es el de asegurar niveles adecuados de amonio en el rumen que permitan una actividad microbiana adecuada. Los taninos presentes en algunas especies de leguminosas forman fuertes enlaces con proteínas y evitan así su degradación ruminal. Hay reportes que indican que los taninos pueden tener efectos positivos sobre el aprovechamiento de las proteínas y además pueden reducir las emisiones de metano, generadas por los rumiantes.²³⁸

Bernal,²³⁹ afirma que el valor de algunas leguminosas tropicales seleccionadas en algunos casos por su buen comportamiento agronómico, podría verse limitado por altos niveles de taninos condensados, pues estos podrían ejercer efectos benéficos o nocivos en animales rumiantes, dependiendo de la cantidad presente en el forraje.

Altos niveles de taninos condensados inhiben el consumo, así como la digestión de la fibra y la proteína lo que resulta en una baja producción animal, cuando se tiene bajas concentraciones de taninos se ha relacionado una mejor utilización del nitrógeno.²⁴⁰

²³⁷ WALLACE, R.J. y COTTA, M.A. *The Rumen Microbial Ecosystem*. Hobson Elsevier Applied Science. London. 1998., p: 217-249.

²³⁸ TIEMANN, T. T., AVILA, P., RAMIREZ, G., HESS, H. D., y LASCANO, C. E. Efecto de taninos extraídos de leguminosas arbustivas sobre la dinámica de fermentación ruminal. En: Segundo seminario los taninos en la nutrición de rumiantes. 2006. p 15.

²³⁹ BERNAL B., Laila. C. Op. cit. p. 83-84.

²⁴⁰ CARULLA, J. E. Forage intake and N utilization by sheep as affected by condensed tanins. A dissertation presented to the Faculty of the Graduate College at The University of Nebraska in partial fulfillment of requirements of the Degree of Doctor of Philosophy. Lincoln, Nebraska. 1994. 126 p.

Resultados de varios estudios muestran que los taninos condensados de diferentes leguminosas tienen efectos diferentes en los procesos de fermentación ruminal. Los taninos de *Calliandra calothyrsus* tuvieron un efecto negativo más significativo sobre la fermentación ruminal en comparación a los taninos de *Flemingia macrophylla* y *Leucaena leucocephala*, según lo reportado por Tiemann *et al.*²⁴¹

Además, que es posible disminuir la degradación de la proteína cruda con la inclusión de proporciones mayores de leguminosas o follaje de arbóreas y arbustivas ricas en taninos, puesto que es factible que esta disminución refleje un aumento en el flujo de proteína “by pass” en rumiantes si se alimentan con este tipo de mezclas.²⁴² Disminuyendo también las emisiones de gas metano y las pérdidas energéticas, mejorándose los niveles de productividad animal.

En el presente estudio se encontró que la presencia abundante de taninos en la *Acacia decurrens*, puede ser una estrategia que permita la implementación de sistemas de producción sostenibles, donde se mejoren los parámetros fermentativos a nivel ruminal por la inclusión en la dieta de esta especie. Sin embargo dado que en este ensayo no se pudo considerar la clase de taninos presentes en la acacia negra, es necesario emprender otro tipo de estudios que permitan aislar y determinar la composición y tipo de dichos compuestos, además de evaluar el efecto sobre la producción de gas y metano ruminal.

6.8.5 3 Aceites esenciales. Según la FEDNA²⁴³, en la actualidad el efecto de los aceites esenciales de los extractos de plantas, han centrado el interés como posibles aditivos para la modulación de la fermentación ruminal.

Sikkema *et al.*²⁴⁴ aseguran que los aceites esenciales son moléculas lipofílicas que tienen actividad antimicrobiana frente a bacterias gram-positivas y gram-negativas

²⁴¹ TIEMANN, T. T., 2006. Op. cit., p. 23

²⁴² BERNAL B., Laila. C. Op. cit., p. 85-87.

²⁴³ FEDNA. 2008. 2006. Op. cit., p. 9

²⁴⁴ SIKKEMA, J., BONT, J.A.M. y POOLMAN, B. Journal of Biology and Chemical Science. 269. 1994. 8022-8028.

debido a su capacidad de interactuar con las membranas citoplasmáticas bacterianas, provocando su inestabilidad y muerte celular.

Los aceites esenciales inhiben la fermentación microbiana ruminal. Se ha determinado que el timol (principio activo del orégano) resulta en la acumulación de aminoácidos y una reducción en la concentración de N amoniacal, lo que sugiere que inhibía la desaminación.

De acuerdo con Sosa *et al*²⁴⁵, debido a las características ecofisiológicas del rumen, en este órgano la metanogénesis ocurre a partir de determinados sustratos, a diferencia de otros sistemas donde se utilizan mayor variedad de fuentes para la formación de metano, lo que tiene efecto significativo en los productos finales de la fermentación. A pesar de las exigencias fisiológicas de las bacterias metanogénicas se ha logrado desarrollar métodos para su estudio, lo que ha posibilitado el aislamiento e identificación de muchos de estos microorganismos en el rumen. En la actualidad, constituye un reto el estudio de factores que influyen en la producción de metano. El empleo de agentes químicos es costoso y provoca efectos colaterales adversos en el ecosistema. Por tal razón, en nuestras condiciones lo más acertado para reducir la metanogénesis ruminal, sería la implementación de prácticas de manejo adecuadas y estrategias nutricionales, como el empleo de plantas taníferas o extractos vegetales con propiedades defaunantes, con estas alternativas se atenuarían en alguna magnitud las pérdidas energéticas por emisiones de metano y consecuentemente se obtendrían productos en sistemas ganaderos amigables con el medio ambiente.

²⁴⁵ SOSA, A. *et al*, 2007. Op. cit., p. 235

7. CONCLUSIONES Y RECOMEDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

- Estas investigaciones permiten el estudio de especies promisorias que además de su potencial en la nutrición animal, ofrecen servicios ambientales en pro de conservar el equilibrio con el medio ambiente.
- El fruto de *Beta vulgaris*, demostró un elevado potencial de producción de gases de efecto invernadero, principalmente metano, expresado por su bajo contenido de proteína, ausencia de taninos, elevadas tasas acumulativas de producción de gas, altos valores de degradabilidad de la MS y MO, junto con alta producción de ácido acético y por ende alta relación Acetato:Propionato,
- *Acacia decurrens*, *Sambucus nigra*, *Ambrosia arborescens* y *Otholobium munityense*, son especies alternativas promisorias para su inclusión en la dieta de rumiantes, ya que contribuyen a disminuir la producción de metano y representan una parte muy importante dentro de las estrategias empleadas en el mundo ante tales efectos de la ganadería.
- Al no encontrarse diferencias estadísticas significativas entre las dos fuentes de inóculo, esta investigación permitió establecer el uso de una fuente de inóculo alternativa al de origen ruminal, obtenido a partir de heces frescas como una técnica de aplicación sencilla al momento de desarrollar investigaciones de este tipo.
- El desarrollo, adecuación y aplicación de la Técnica *In vitro* de producción de gases bajo las condiciones de altura sobre el nivel del mar de los laboratorios de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Universidad de Nariño, permitió establecer una ecuación de regresión aplicable a posteriores investigaciones.
- Con la implementación de la técnica *In vitro* de producción de gases, queda abierta la posibilidad de realizar futuras investigaciones en la valoración de

alimentos para rumiantes e incluso para especies monogástricas, que permitan evaluar parámetros como la cinética de digestión, la desaparición de la materia seca y materia orgánica, y obtener estimativos de la emisión de gases con potencial de efecto invernadero.

- El procedimiento implementado demostró su viabilidad para evaluar *In vitro* el valor nutritivo de especies arbóreas y arbustivas, de uso poco convencional y de identificar aquellas con potencial de utilización en sistemas silvopastoriles que además ofrezcan servicios ambientales
- Los sistemas de producción animal actuales deben tener en cuenta diversas alternativas relacionadas con el manejo de las pasturas, suplementación y complementación de la dieta forrajera a fin de garantizar mejores rendimientos productivos y a la vez menores emisiones de gases con impacto ambiental negativo como el metano.

7.2 RECOMENDACIONES

- Desarrollar nuevas investigaciones con el fin de obtener información importante de la valoración nutricional de los alimentos.
- Realizar una evaluación de los recursos forrajeros con potencial de ser incluidos en la alimentación animal previo tratamiento o modificación, ya sea por medio de técnicas como el ensilaje, heno o henolaje.
- Promover estudios *In vitro* que se complementen con pruebas *In vivo* donde se evalúen niveles de inclusión de especies con presencia de taninos lo que permita establecer dietas que además de favorecer la reducción del impacto ambiental no dejen de lado la eficiencia productiva.
- Emplear sistemas silvopastoriles como una de las herramientas primordiales para mitigar los efectos del cambio climático sobre la producción pecuaria, siendo necesario “adaptar” mas no “adoptar” modelos según las necesidades y potencialidades de los productores en cada zona

de vida, empleando especies nativas, propias del lugar donde se desarrolla la actividad productiva.

- Realizar pruebas cuantitativa y de identificación y composición estructural para los taninos presentes en *Acacia decurrens*, *Ambrosia arborescens*, *Otholobium munyense* y *Sambucus nigra* que pueden ser eficientes en la disminución de las emisiones de metano.
- Ampliar el horizonte de investigación en recursos forrajeros arbóreos y arbustivos con fines de identificar aquellos que presenten componentes que favorezcan la disminución de las emisiones de gases de efecto invernadero
- Desarrollar investigaciones relacionadas con las emisiones de metano en rumiantes jóvenes e incluso en pequeños rumiantes.
- Validar el uso de la fuente de inóculo obtenida a partir de las heces mediante el aporte de evidencia objetiva a través de conteo microbiano y la determinación de precisión y exactitud en resultados obtenidos de varias réplicas, lo que corrobore que éste cumple con los requisitos particulares para el uso previsto.
- Poner en práctica el estudio y empleo de estrategias nutricionales encaminadas a manipular la fermentación ruminal como el uso de plantas taníferas o con niveles aceptables de saponinas en arreglos silvopastoriles, extractos de plantas o aceites esenciales, plantas con efecto defaunante o antimetanogénico, modificaciones en la presentación de los alimentos, picado o molido de los forrajes o alimentos fibrosos, e incluso el empleo de lípidos en la dieta y la adición de ionóforos.

BIBLIOGRAFÍA

ABREU A., CARULLA, J.E, KREUZER, M., LASCANO, C., DÍAZ, T.E., CANO, A., HESS, H.D. Efecto del fruto, del pericarpio y del extracto semipurificado de saponinas de *Sapindus saponaria* sobre la fermentación ruminal y la metanogénesis *in vitro* en un sistema RUSITEC. Rev Col Cienc Pec. 2003; 16: p. 147-154

ALVAREZ N, Diana M. Evaluación *In vitro* de leguminosas tropicales como fuente de proteína para rumiantes. Trabajo de grado para optar al título de Zootecnista. Palmira Valle del Cauca. Universidad Nacional de Colombia, 2000. 120 p.

ANDERSON, R.C. and RASMUSSEN, M.A. Use of a novel nitrotoxinmetabolizing bacterium to reduce ruminal methane production. Bioresource Technology. 1998; 64: 89-95

AOAC. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. 1995. International Suite 400. 2200 Wilson Boulevard. Arlington Virginia USA. 16th edition. p. 2.201-3.301.

BACH, A., S. CALSAMIGLIA and M.D STEERN. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. J.Dairy Sci. 88 (E. Suppl.): E9-E21.

BALDERAS TORRES, A., ONTIVEROS ENRÍQUEZ, R., LOVETT, J. C., SKUTSCH, M. (2009). Estudio de la biomasa aérea arbórea en bosques de encino-pino en el Bosque La Primavera. Resultados preliminares. / *Simposio Mexicano del Carbono. Programa Mexicano del Carbono* 7 al 9 de Octubre, 2009. Ensenada México.

BERNAL, B. Laila C. Efecto de las mezclas de las leguminosas *Calliandracalothyrsus*, *Flemingiamacrophylla*, *Cratylia argénte*a y *Vigniaunguiculata* ensiladas y henificadas sobre los parámetros de fermentación ruminal *In vitro* y producción de leche en bovinos. Palmira – Valle del Cauca. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela de Postgrados. Tesis de grado presentada como requisito para optar al título de Magíster en Ciencias Agrarias con énfasis en producción animal tropical. 2007. 119 p.

BEUVINK, J.M. W. and SPOELTRA, S.F.and HOGENDORP, R.J., 1992. An automated method for measuring time-course of gas production of feestuffs incubated with buffered rumen fluid. Netherland Journal of Agricultural Sience 40:401-407.

BLAXTER, K, L. Metabolismo Energético de los Rumiantes. Ed. Acribia, Zaragoza. 1964. 314 p.

BLAXTER, K.L., CLAPPERTON, J.L. Metabolismo energético de los rumiantes. Ed. Acribia, Zaragoza. 1965. 314 p.

BLÜMMEL, M.; and ØRSKOV E.R. 1993; Comparison of *In vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 40:109-119.

BOGAERT, C., JOUANY, J.P. y JEMINET, G.. Effects of the ionophore antibiotics monensin, monensin-propionate, abierixin and calcimycin on ruminal fermentations *in vitro* (Rusitec). *Anim. Feed Sci. Tech.* 1990. 28:183.

BONDI, A., A. Nutrición Animal en Rumiantes y Monogástricos. Editorial Acribia Zaragoza-España. 1989.

BOTERO, R. y R.O. RUSSO. 1997a. Utilización de árboles y arbustos fijadores de nitrógeno en sistemas sostenibles de producción animal en suelos ácidos tropicales. *In* III Seminario Manejo y Utilización de Pastos y Forrajes en Sistemas de Producción Animal. R. Tejos, C. Zambrano, M. Camargo L.E. Mancilla W. García (eds.). UNELLEZ, Barinas, 20-22 de febrero de 1997. pp. 49-63.

----- . 1997b. Árboles y arbustos en producción animal en suelos ácidos del trópico. *Carta Ganadera (Colombia)* septiembre 1997, p. 43-47.

----- . 2005. El componente arbóreo como recurso forrajero en los sistemas silvopastoriles. Escuela de Agricultura de la Región Tropical Húmeda, EARTH, San José, Costa Rica. [En línea]. [Consultado agosto 30 de 2011]. Disponible en internet:

http://www.produccionbovina.com/produccion_y_manejo_pasturas/manejo%20silvopastoril/42-componente_arboreo.pdf.

BREMER B., BREMER K., MARK W. CHASE, MICHAEL F. FAY, JAMES L. REVEAL, DOUGLAS E. SOLTIS, PAMELA S. SOLTIS Y PETER F. STEVENS. The Angiosperm Phylogeny Group III. 2009. «An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* p. 105-121. [En línea] [citado 8 de agosto de 2011] disponible en internet: <<http://www3.interscience.wiley.com/journal/122630309/abstract>.>

BRUNI, M. de los A., CHILIBROSTE, P. Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. Departamento de Producción Animal y Pasturas - EEMAC, Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Uruguay. 2001.

CALLE DÍAZ, Z., NARANJO, J.F., y MURGUEITIO R., E. El tilo: puerta de entrada a los silvopastoriles en el trópico alto. *En Carta Fedegán* No. 110. 2010.

CALSAMIGLIA, S., CASTILLEJOS, L. y BUSQUET, M. Federación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal – FEDNA. Estrategias nutricionales para modificar la fermentación ruminal en vacuno. Madrid, 2005. 171 p.

CARMONA Juan C., BOLIVAR, Diana., GIRALDO, Luis A. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. En: Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Vol. 18:1, 2005, p 49 – 63.

CARULLA, J. E. Forage intake and N utilization by sheep as affected by condensed tanins. A dissertation presented to the Faculty of the Graduate College at The University of Nebraska in partial fulfillment of requirements of the Degree of Doctor of Philosophy. Lincoln, Nebraska. 1994. 126 p.

CARVAJAL T., Juliana I., Digestibilidad *In vitro* Prececal Y Cecal De Plantas Forrajeras Tropicales Para La Nutrición En Cerdos. Universidad Nacional De Colombia Facultad De Ciencias Agropecuarias. Palmira. 2010.

CHAMBERLAIN, A.T. The gas production capacity of purified chemicals and feedstuffs when incubated *In vitro* with rumen microbes as a posible indicator of energy availability in the rumen. In: British Society of Animal Production. Jubilee Winter Meeting. 1994. N° 91.

COLOMBIA, MINISTERIO DE AGRICULTURA, Gobernación de Nariño. Consolidado agropecuario 2005, San Juan de Pasto, 2006. p. 86-87.

CONE, J. W., GELDER, A. H., VAN VISSCHER, G. J. W. 1996. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time released gas production apparatus. *Animal Feed Science and Technology* 61: 113-128

COOPERATIVA DE PRODUCTORES LÁCTEOS DE NARIÑO, Colácteos. Criterio administrativo de clasificación. 2010.

CRUZ, M.; SANCHEZ, J. La fibra en la alimentación del Ganado lechero. Centro de investigaciones en nutrición animal (CINA). Universidad de Costa Rica. San Jose, Costa Rica. 2008. [En línea] [Citado 09 de agosto de 2011]. Disponible en: <http://www.feednet.urc.ac.cr/bromatologia/bfagl.htm>.

CZERKAWSKI JW, BRECKENRIDGE G. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition*, 1977; 38: 371-384. Citados por Carmona *et al.* El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. Vol. 18-1 2005.

DAVIES D.R., THEODOROU M.K., BAUGHAN J., BROOKS A.E. and NEWBOLD J.R. 1995. An automated pressure evaluation system (APES) for determining the

fermentation characteristics of ruminant feeds. *Annales de Zootechnie* 44 (Suppl 1), 36.

DE RAMUS HA, CLEMENT TC, GIAMPOLA DD, DICKISON PC. Methane emissions of beef cattle on forages: efficiency of grazing management systems. *Journal Environ Qual*, 2003; 32: 269-277.

DIARIO EL ESPECTADOR. Bogotá D.C. Noviembre de 2008, Atlas del Estudiante. Dorling Kindersley.

DONG, Y., BAE, H.D., Mc ALLISTER, T.A., MATHISON, G.W. y CHENG, K.J. Effects of exogenous fibrolytic enzymes, Lbromoethanosulfate and monensín on fermentation in a rumen simulation (RUSITEC) system. *Can. J. Anim. Sci.* 1999. 79:491.

DUNCAN, A.J. and, MILNE, J.A.. Glucosinolates. Aspects of Applied Biology, Antinutritional factors, potentially toxic substances in plants. s.l.: Institute of Horticultural Research, 1989. p. 75-92

FEDERACION COLOMBIANA DE GANADEROS – FEDEGAN. Plan Estratégico de la Ganadería Colombiana PEGA 2019. Por una ganadería moderna y solidaria. Santa fe de Bogotá, Colombia. Noviembre de 2006. p 296

FEDERACIÓN ESPAÑOLA PARA EL DESARROLLO DE LA NUTRICIÓN ANIMAL, FEDNA, Contribución de los rumiantes a las emisiones de gases con efecto invernadero. 2008. 30 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, FAO. Agricultura y el cambio climático. [En línea] *Revista Agro 21*. [citado 9 de Agosto de 2011]. Disponible en internet: <<http://www.fao.org/ag/esp/revista/0103sp2.htm>>

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, FAO. Evaluación de los recursos forestales mundiales. Informe principal. [En línea]. 2000 [consultado en 05 de Febrero de 2010]. Disponible en internet: <www.fao.org/docrep/005/y1997s/y1997s00.htm>

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, FAO. Las repercusiones del ganado en el medio ambiente, el desafío estriba en reconciliar dos demandas: la de productos animales y la de servicios ambientales. [En línea]. 2006. [consultado en 09 de Agosto de 2011]. Disponible en: <<http://www.fao.org/ag/esp/revista/0612sp1.htm>>

GARCIA, R. Alimentos para rumiantes. Tablas de valor nutritivo. Habana: Instituto de ciencia Animal, 1989. p. 40.

GETACHEW, G. *et al.* *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. En: *Animal Feed Science and Technology*. Vol. 72; 1998; p. 261–281.

GINER-CHAVEZ B. I. 1996. Condensed tannis in tropical forages. Ph.D. dissertation. Cornell University. N.Y. USA.

GIRALDO, L.A., GUTIÉRREZ, L.A., SÁNCHEZ, J. y BOLIVAR, P. A. Relación entre presión y volumen para el montaje de la técnica *In vitro* de producción de gas en Colombia. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Laboratorio de Biotecnología Ruminal (BIORUM).

GÓMEZ, M.E., L. RODRÍGUEZ, E. MURGUEITIO, C.I. RÍOS, M. ROSALES, C.H. MOLINA, E. MOLINA Y J.P. MOLINA. 1995. Árboles y arbustos forrajeros utilizados en alimentación animal como fuente proteica: Matarratón (*Gliricidia sepium*), Nacedero (*Trichantera gigantea*), Pízamo (*Erythrina fusca*) y Botón de oro (*Tithonia diversifolia*). CIPAV, Cali, Colombia. 129 p.

HANSSEN VILLAMIZAR, Henry, QUINTERO BERTEL, Quelbis Román. Resultados preliminares del proyecto de investigación financiado por el sistema universitario de investigaciones de la Universidad Autónoma de Colombia. Obtención de bioetanol carburante a partir de la remolacha (*Beta vulgaris* L.). Santa Fe de Bogotá. Colombia. 2006.

HARPER, L.A., DENMEAD, O.T., FRENEY, J.R., BYERS, F.M. Journal of Animal Science. 1999. 77, 1392 – 1401.

HERBARIO UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA. Familia Poaceae. [En línea] [consultado en 4 de agosto de 2011] disponible en: <<http://www.unavarra.es/servicio/herbario/htm/Gramineae.htm>>

HESS, Hans D., STURM, Christoph D. y TIEMANN, Tassilo T. Dinámica de fermentación ruminal de mezclas de leguminosas con contenidos y tipos de taninos contrastantes. En: Segundo taller de Taninos en la nutrición de rumiantes en Colombia. Bogotá. Noviembre 30 y diciembre 01 de 2006. p. 27-29

HOLDRIDGE L., R. Sistema de clasificación de las Zonas de Vida Natural del Mundo. En: Recopilación de documentos. 1998. p., 145.

HUNGATE 1966. The rumen and its microbes. Academic Press, New York.

HUNGATE, R. E. FLETCHER, D.W., DOUGHERTY, R. W., and BARRENTINE, B.F. 1955. Microbial activity in the bovine rumen: its measurement and relation to bloat. Applied Microbiology. 1:106-110.

INSTITUTO CIENTÍFICO DE INVESTIGACIÓN AGRONÓMICA, INRA. Alimentación de los rumiantes. Ed. Mundi Prensa, Madrid. 1981. 697 p.

INSTITUTO GEOGRAFICO AGUSTIN CODAZZI, IGAC. 2010

J.C. KU VERA, L. RAMÍREZ AVILÉS, G. JIMÉNEZ FERRER, J.A. ALAYÓN Y L. RAMÍREZ CANCINO. Árboles y arbustos para la producción animal en el trópico

Mexicano. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán. 2008

JOHNSON K, A., JOHNSON D, E. Methane emissions from cattle. *J Anim Sci*, 1995; 73: 2483-2492.

KAJIKAWA H, HAI J, TERADA F, SUGA T. Operation and characteristics of newly improved and marketable artificial rumen (Rusitec). In: *Memoirs of National Institute of Livestock and Grassland Science*. N° 2. Mar. 2003. Citados por CARMONA J. C., *et al.* 2005.

KINSMAN R, SAUER FD, JACKSON HA, WOLYNETZ, MS. Methane and carbon dioxide emissions from cows in full lactation monitored over a six-month period. *J Dairy Sci*, 1995; 78 (12): 2760-2766

KREUZER, M., HINDRICHSEN, I.K. Methane mitigation in ruminants by dietary means: The role of their methane emission from manure. *International congress series*. 2006. 199 – 208 p.

KUMAR R. Antinutritional factors. The potential risks of toxicity and the methods to alleviate them. S.I.: Speedy A.W., 1992. p. 145-160.

KURIHARA M, MAGNER T, McCRABB H, McCRABB G. Methane production and energy partition of cattle in the tropics. *British Journal of Nutrition*, 1999; 81: 227-234.

LAREDO, M. y CUESTA, P. 1988. Tabla de contenido nutricional en pastos y forrajes de Colombia. Instituto Colombiano Agropecuario. Programa de Nutrición Animal. Santa Fe de Bogotá, Colombia. 77 p.

LASCANO C. y PALACIOS E. Intake and digestibility by sheep fed mature grass alone and in combination with two tropical legumes. *Tropical Agriculture (Trinidad)*. 1993. 70:365-358

LENG, Ron, A. Ruminant production and greenhouse gas emissions. *Proceedings of the New Zealand of Animal Production*. 1992. p 52

LÓPEZ S, CARRO M D, GONZÁLEZ J S y OVEJERO F J. Comparison of different *In vitro* and *in situ* methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*. 1998. 73: 99-113.

LÓPEZ S., *et al.* Comparison of different *In Vitro* and *In Situ* methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 1998. p. 99-113.

LOTERO, J. Producción, utilización y mejoramiento de los pastizales de las zonas alto andinas de Colombia. Red de pastizales Andinos. REPAAN. Quito, Ecuador. 1993. 155 pág.

LUNA, M, A., GUERRERO, I, P. Reconocimiento, Identificación Taxonómica y Análisis Bromatológico de Arvenses con potencial forrajero, para la Alimentación de Bovinos y Ovinos de Carne, en la Zona de Bosque Muy Seco Tropical (Bms-T); Veredas Remolino (Nariño), Mojarras y El Vado (Cauca). San Juan de Pasto: Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Pecuarias. Tesis de grado presentada como requisito para optar al título de Zootecnista. 2009. 165 p.

MACHMULLER, A. CLARK, H. First results of a meta-analysis of the methane emission data of New Zealand ruminants. International Congress Series. 2006. 54-57 p.

MAKKAR, Harinder. Recent advances in vitro gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. 2003

MATOS, A. A., OJEDA, Á., CARDOZO, A. R. Composición química, degradabilidad y producción de gas *In vitro* del follaje de doce cultivares de Rábano forrajero (*Raphanus sativus* L.). Revista Cubana de Ciencia Agrícola, vol. 44, núm. 3, 2010, pp. 261-266 Instituto de Ciencia Animal La Habana, Cuba.

MAURICIO R, M., MOULD F, L., DHANOA M, S., OWEN E., CHANNA K, S., *et al.* A semi-automated *In vitro* gas production technique for ruminants feedstuff evaluation. Anim Feed Sci Technol 1999; 79: p. 321-330

Mc CAUGHEY W, WITTENBERG K, CORRIGAN D. Methane production by steers on pasture. Can J An Sc, 1997; 76 (3): 519-524.

----- . Impact of pasture type on methane production by lactating beef cows. Can J An Sc, 1999; 79 (2): 221-226.

Mc GINN, S.M., BEAUCHEMIN, K.A., COATES, T. y COLOMBATTO, D. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. J. Anim. Sci. 82:3346. 2004.

MENKE K. H. and STEINGASS, H. 1988. Estimation of the energetics feed value obtained from chemical analysis and *In vitro* gas production using rumen fluid. Animal Research and development.

MENKE K. H. and STEINGASS, H. 1988. *Óp cit.*

MENKE, K.H., RAAB, L., SALEWSKI, A., STEINGASS, H., FRITZ, D. and SCHNEIDER. 1979. Estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuff from the gas production when they are incubated with rumen liquor *In vitro*. J. Agric. Science 93:217- 222.

MERA ALVAREZ, M.I. Efecto de leguminosas forrajeras tropicales ricas en taninos sobre la fermentación y la producción de metano en un sistema *In vitro* (RUSITEC). Trabajo de grado para optar al título de Zootecnista. Universidad

Nacional de Colombia. Sede Palmira. Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT. Laboratorio de forrajes. 2004. 78 p.

METABOLISMO DE los carbohidratos en el rumen. Monografías de Medicina Veterinaria, Vol.5, N°2, diciembre 1983. [citado 5 de Mayo de 2011]. Disponible en <http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/CDA/mon_vet_simple/0,1420,SCID%253D7693%2526ISID%253D410%2526PRT%253D7627,00.html>

MILLÁN, H. y MORENO, F. 2005. Evaluación agronómica de arbóreas multipropósito en la sabana de Bogotá. Tesis de Zootecnista. , Bogotá D.C. Universidad Nacional de Colombia. 75 p.

MOE, P.W., TYRRELL, H.F. Journal of Dairy Science. 1979. 62. 1583 – 1568.

MOHAMMED, N., AJISAKA, N., LILA, Z.A., KOJI HARA, MIKUNI, K., HARA, K., KANDA, S. and ITABASHI, H. Effect of Japanese horseradish oil on methane production and ruminal fermentation in vitro and in steers. J. Anim. Sci. 82:1839. 2004.

MONTAGNINI, F., Sistemas silvopastoriles y mitigación del cambio climático: alternativas para aumentar la captura de Carbono. Yale School of Forestry & Environmental Studies. 2005.

MONTENEGRO, Johnny., ABARCA, Sergio. Fijación de carbono, emisión de metano y de óxido nitroso en sistemas de producción bovina en Costa Rica. En: Intensificación de la ganadería en Centroamérica: beneficios económicos y ambientales. CATIE – FAO – SIDE. Ed Nuestra Tierra. 2000. 334 p.

MOSS AR, JOUANY JP, NEWBOLD J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. INRA EDP Sciences. Ann Zootech, 2000; 49: p. 231-253

MUELLER - HARVEY And Mc ALLAN. 1992. Tannins and I their biochemnistry and nutritional propertis. Adv. Plant Cell Biochem. And Biotec. 1. p. 151-217.

NAGARAJA, T.G., NEWBOLD, C.J., Van NEVEL, C.J. y DEMEYER, D.I. Manipulation of ruminal fermentation. En: The Rumen Microbial Ecosystem. Hobson, P.N. & Stewart, C.S. Eds. Blackie Academic & Professional. London. 1997. p. 523.

NARVAEZ VASQUEZ N. Caracterización nutritiva de especies arbóreas con potencial forrajero en Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela de Postgrados. Tesis de grado presentada como requisito para optar al título de Magíster en Ciencias Agrarias con énfasis en producción animal tropical. 2000. 150 p.

NHERERA *et al* 1999. En: Técnica *In Vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. [online]. Citado por:

POSADA S. L., y NOGUERA R.R. En: Livestock Research for Rural Development. 2005. [Fecha de consulta Marzo 25 de 2010]. Disponible en internet: <<http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd17/4/posa17036.htm>>

NIEVES, Duilio, ARAQUE, Humberto, TERAN, Omar *et al.* Digestibilidad de Nutrientes del Follaje de Morera (*Morus alba*) en Conejos de Engorde. *Rev. Cient. (Maracaibo)*. [online]. vol.16, no.4 [citado 02 Agosto 2011], p.315-324. Disponible en internet: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592006000400005&lng=es&nrm=iso>.

NOGUEIRA J., FONDEVILA M., BARRIOS A. y GONZÁLES, M. *In vitro* microbial fermentation of tropical grasses at an advanced maturity stage. *Animal Feed Science and Technology* 2000. 83: 145- 157.

NOGUERA J.R. Estudio químico, “*In situ*”, “*In vitro*” e microscópico da parede celular de cinco genótipos de sorgo colhidos em três épocas de corte. *Ph. D. Thesis*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2002. 148p.

NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. National Academy Press. Washington D.C. 2001. 381 p.

NSAHLAI, I. V., UMUNNA, N. N., NEGASSA, D. The effect of multi-purpose tree digesta on *In vitro* gas production from napier grass or neutral-detergent fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1995. 519-528.

OPATPATANAKIT, Y., KELLAWAY, R. C., LEAN, I. J., ANNISON, G., KIRBY, A., Microbial fermentation of cereal grains *In vitro*. *Australian Journal of Agricultural Research*. 1994. 1247-1263.

ORGANIZACIÓN PARA LA EDUCACIÓN Y PROTECCIÓN AMBIENTAL. OPEPA. [En línea] [citado 4 de agosto de 2011] disponible en internet: <http://www.opepa.org/index.php?option=com_content&task=view&id=435&Itemid=30>

ØRSKOV E., R., *et al.* Uso de la técnica de la bolsa de nylon para la evaluación de alimentos. En: *Producción Animal Tropical*. Vol. 12 - 1980. p. 213-223.

OSPINA, Harold., GIL Jorge Luis. Desafíos Socio-Económicos y Ambientales en los Sistemas Ganaderos del Futuro. En: *Revista Comité de ganaderos del centro y norte del Valle, Cogancevalle*. Dic. 18 de 2010. Vol. 71. p 23.

PELL A, N., DOANE P, H., SCHOFIELD P. *In vitro* digestibility and gas production.: Simpósio sobre Tópicos Especiais em Zootecnia, Lavras, MG; 1997. 109 –132 p.

PELL A. N. and SCHOFIELD P. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *In vitro*. *J. Dairy Sci.* 76:1063-1073

PONTIFICA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE. Productos hortícolas de la familia Brassicaceae. [En línea] [citado 8 de agosto de 2011] disponible en internet: <http://www.uc.cl/sw_educ/hort0498/HTML/p019.html>

POSADA Sandra Lucia. Valoración de las heces y el líquido ruminal como inóculos en la técnica *In vitro* de producción de gases. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, 2006. 78p.

POSADA, Sandra Lucia., NOGUERA, Ricardo. Técnica *In vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. [en línea], 2005. En: Livestock Research for Rural Development. [citado 05 de Febrero de 2010]. Disponible en internet: <<http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd17/4/posa17036.htm>>

PRESTON, T.R. Y R.A. LENG. 1989. Ajustando los sistemas de producción pecuaria a los recursos disponibles: aspectos básicos y aplicados del nuevo enfoque sobre la nutrición de rumiantes en el trópico. Condit. Cali, Colombia. 312 p.

PRIMAVESI O, SHIRAIISHI RT, DOS SANTOS M, APARECIDA M, TERESINHA T, FRANKLIN P. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. Pesq agropec bras, 2004 39 (3): 277-283.

PRIMAVESI O. *et al.* Metano entérico de bovinos. En: Leiteiros em condições tropicais brasileiras. Pesq agropec bras. Vol 12 (2). 2004. p. 277-283.

PRINS, R.A., Van NEVEL, C.J. y DEMEYER, D.I. Pure culture studies of inhibitors for methanogenic bacteria. Antonie Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol. 1972. 38:281.

PROEXPORT – FEDEGAN. Abriendo puertas, cerrando negocios. Sector cárnico en Colombia. [En línea]. Bogotá, enero de 2010; [citado 17 de agosto de 2011]. Disponible en internet: <[http://www.inviertaencolombia.com.co/Adjuntos/294_\(Microsoft%20Word%20%20PerfilCarnicoEspa.pdf](http://www.inviertaencolombia.com.co/Adjuntos/294_(Microsoft%20Word%20%20PerfilCarnicoEspa.pdf)>

ROSETO N. R. Suplementación de bovinos a pasto. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Antioquia. 2005.

RUALES DEL CASTILLO, L.C., RECALDE A., DIAZ VELASQUEZ M. Caracterización de especies silvestres arbóreas y arbustivas con potencial forrajero en la zona de influencia de la granja lechera Chimangual. Especialización en producción de recursos alimentarios para especies pecuarias. Universidad de Nariño. 2010.

SANABRIA C. P., BARAHONA, MONSALVE, L. M., TIEMANN T.T., LASCANO, HESS H.D., MARTIN MARTINEZ E. y RODRIGUEZ F. Monitoreo de las dinámicas

poblacional In vivo de los principales grupos de microorganismos ruminales en respuesta a la inclusión de *Vigna unguiculata*, *Flemingia macrophylla* y *Calliandra calothyrsus* en la dieta de ovinos africanos. En: Segundo Taller de Taninos en la Nutrición de Rumiantes en Colombia. Bogotá noviembre 30, diciembre 1 de 2006. p 35-38

SÁNCHEZ, J.E. Utilización del aserrín de pino (*Pinus ponderosa*) como sustituto de rastrojo de maíz en raciones para ganado de engorda. [En línea]. México 1976. [Citado 18 de agosto de 2011] disponible en internet: <<http://www.fao.org/DOCREP/006/Y4435S/y4435s0h.htm>>

SIERRA, José Oscar. Monitoreo o aforo del rendimiento de forraje para el cálculo de la carga animal en sistemas de pastoreo racional y el ajuste de carga en pesajes intermedios. 2006. p 1 – 3

SIKKEMA, J., BONT, J.A.M. y POOLMAN, B. Journal of Biology and Chemical Science. 269. 1994. 8022-8028.

SILESHI Z, OWEN E, DHANOA M S, THEODOROU M K. Prediction of in situ rumen dry matter disappearance of Ethiopian forages from an *In vitro* gas production technique using a pressure transducer, chemical analyses or *In vitro* digestibility. Animal Feed Science and Technology. 1996. 61: 73-87.

SMITH V. N. Profesor de Genética y Mejoramiento Forestal. Universidad de Talca. Santiago de Chile. En metodologías para el muestreo para la selección de árboles. [online]. 1993. [Fecha de consulta 17 de Junio de 2010]. Disponible en internet: <<http://www.cesaf.uchile.cl/cesaf/n2/indice.htm>>.

SOSA, A., GALINDO, J., BOCOURT, R. Metanogénesis ruminal: aspectos generales y manipulación para su control Revista Cubana de Ciencia Agrícola, vol. 41, núm. 2, 2007, pp. 105-114 Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba.

STACEY D. SMITH AND DAVID A. BAUM. Core Malvales. Version 25 March, 2003. In: The Tree of Life Web Project. [En línea] [citado 8 de agosto de 2011] disponible en internet: <http://tolweb.org/Core_Malvales/21172.>

STEWART CS. The rumen bacteria. In: Jouany, JP. Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. INRA editions, Paris, France, 1991; 15-26

THEODOROU M, K., WILLIAMS B, A., DHANOA M, S., MCALLAN A, B., FRANCE J. A Simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Anim Feed Sci and Technol 1994; 48:185-197.

THEODOROU, M.K., DAVIES, D.R., NIELSEN, B. B. LAWRENCE, M. I. G. and TRINCI, A.P.J., 1995. Determination of growth of anaerobic fungi on soluble and

cellulose substrate using a pressure transducer. Journal of general microbiology. 141: 671-678.

TIEMANN, T. T., AVILA, P., RAMIREZ, G., HESS, H. D., y LASCANO, C. E. Efecto de taninos extraídos de leguminosas arbustivas sobre la dinámica de fermentación ruminal. En: Segundo seminario los taninos en la nutrición de rumiantes. 2006. p 15.

TIEMANN, Tassilo., HESS, Hans D., LASCANO, Carlos. Leguminosas arbustivas con taninos: Potencial y limitaciones para la alimentación del ganado en el trópico. Swiss Centre for International Agriculture Schweizerisches, Zentrum für Internationale Landwirtschaft and the Centre Suisse pour l'Agriculture Internationale, Centro internacional de Agricultura Tropical CIAT, Corpoica y Universidad de Antioquia. Palmira, Junio de 2006.

TORRES ROMERO, J. H. Contribución al conocimiento de las plantas tánicas registradas en Colombia. Instituto de Ciencias Naturales Museo Histórico natural Universidad Nacional. Fondo Colombiano de Investigaciones científicas y Proyectos especiales Francisco José de Caldas – COLCIENCIAS. Bogotá. 1983.175 p.

UNIVERSIDAD DE CHILE. Laboratorio de relación suelo – agua – planta. Facultad de Ciencias agrónomas. [En línea] [citado 4 de agosto de 2011] disponible en internet:

<http://www.sap.uchile.cl/descargas/publicacion/Evaluaci%F3n__del_Rendimiento_Potencial_y_Bajo_estr%E9s_h%EDdric~1.pdf>

UNIVERSIDAD DE NARIÑO, Departamento de Geografía, 2005.

VALENCIA TRUJILLO, F.L. Efecto de la mezcla de leguminosas tropicales en relación con la presencia de taninos y emisiones de metano en un sistema *In vitro* (RUSITEC). Tesis de grado presentada para obtener el título de Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en producción animal tropical. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. 2003. 83 p.

VAN KESSELL JS, RUSSELL JB. The effect of pH on ruminal methanogenesis. FEMS Microbiology Ecology, 1996; 20: 205-210.

VAN SOEST, P.J. Nutritional Ecology of the Ruminant. 2° Ed. Comstock. Cornell University Press. 476 p.

VARGAS Julio, DELGADILLO Lucia. Plantas forrajeras utilizadas por campesinos para alimentar animales en el Valle del Cauca. Cali – Valle. CIPAV. 1998. 50 p.

WALLACE, R.J. y COTTA, M.A. *The Rumen Microbial Ecosystem*. Hobson Elsevier Applied Science. London. 1998., p: 217-249.

WILLIAMS, 2000. En: Técnica *In Vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. [online]. Citado por: POSADA S. L., y NOGUERA R.R. En: Livestock Research for Rural Development. 2005. [Fecha de consulta Marzo 25 de 2010]. Disponible en internet: <<http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd17/4/posa17036.htm>.>

WICKENS, G.E. 1980. Alternative uses of browse species. *In* Browse in Africa : the current state of knowledge. Edited by H.N. Le Houérou. ILCA, Addis Ababa . pp. 155-182.

WOLIN, M.J. A theoretical rumen fermentation balance. En: Journal of. Dairy Science. 2000. 43: p 1452-1459.

YOKOYAMA MT, JOHNSON KA. Microbiología del rumen e intestino. En: Church DC. El rumiante: fisiología digestiva y nutrición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España, 1993; 137-156.

ANEXOS

Anexo A. Protocolo Técnica *In vitro* de producción de gases

TÉCNICA *In vitro* DE PRODUCCIÓN DE GASES

(Brooks, A. and Theodorou, M. K. 1992)

(Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT 2011)

(Adatado por Narváez J. P., Delgado J. M. Universidad de Nariño – Pasto – Colombia 2011)

PROTOCOLO

La técnica de producción de gases es otro método *In vitro* que permite determinar la extensión y la cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo (Theodorou et al 1994). Una de las ventajas de este procedimiento es que el curso de la fermentación y el papel de los componentes solubles del sustrato puede ser cuantificado (Pell et al 1997).

Además, a través de la técnica de producción de gas se ha tratado de dar solución a otro problema inherente a los métodos *In situ* e *In vitro* como es el estudio de las fases tempranas de la fermentación, ya que los procedimientos gravimétricos no son lo suficientemente sensibles para medir los pequeños cambios que ocurren en el peso del sustrato durante las primeras horas de fermentación (Rosero 2002).

Al igual que otras técnicas de bioensayo, la técnica de producción de gases emplea sustratos molidos, medio anaeróbico, temperatura de 39°C e inóculo ruminal (Williams 2000). La técnica puede medir el volumen de gas a presión atmosférica constante, la presión de gas a un volumen fijo, o hace una combinación de ambos procedimientos; disponiendo para tal efecto de metodologías manuales, semiautomáticas y automáticas.

Los perfiles de producción de gas obtenidos pueden ajustarse a diferentes ecuaciones para resumir la información cinética, permitiendo la comparación de los sustratos, la evaluación de diferentes ambientes de fermentación y la obtención de las tasas de fermentación de los constituyentes solubles y estructurales.

Si determinaciones gravimétricas son realizadas a determinados intervalos de tiempo, la producción de gas por unidad de materia seca o de materia orgánica puede ser cuantificada.

SOLUCIONES REQUERIDAS

	Base	30 Botellas	60 Botellas	80 Botellas	100 Botellas	120 Botellas	150 Botellas
Solución Buffer	g/litro	g/1020 ml	g/2040 ml	g/2720 ml	g/3400 ml	g/4080	g/5100 ml
Amonium hydrogen Carbonate (NH ₄ HCO ₃)	4	4,08	8,16	10,88	13,6	16,32	20,4
Sodium hydrogen Carbonate (NaHCO ₃)	35	35,7	7,14	95,2	119	142,8	178,5
Solución macro-mineral	g/litro	g/1020 ml	g/2040 ml	g/2720 ml	g/3400 ml	g/4080	g/5100 ml
Di-Sodium hydrogen Orthopospate (Na ₂ HPO ₄ -12 H ₂ O)	9,45	4,56	9,12	12,16	15,2	18,24	22,8
Potassium di-hydrogen Orthopospate (KH ₂ PO ₄)	6,2	6,324	12,648	16,864	21,08	25,296	31,62
Magnesium sulphate (MgSO ₄ -7H ₂ O)	0,6	0,612	1,224	1,632	2,04	2,448	3,06
Solución micro-mineral	g/100 ml	g/3 ml	g/6 ml	g/8 ml	g/10 ml	g/12 ml	g/15 ml
Calcium chloride 2-hydrate (CaCl ₂ -2H ₂ O)	13,2	0,396	0,792	1,056	1,32	1,584	1,98
Manganese chloride 4-hydrate (MnCl ₂ -4H ₂ O)	10	0,3	0,6	0,8	1	1,2	1,5
Cobalt chloride 6-hydrate (CoCl ₂ -6H ₂ O)	1	0,03	0,06	0,08	0,1	0,12	0,15
Ferric chloride 6-hydrate (FeCl ₃ -6H ₂ O)	8	0,24	0,48	0,64	0,8	0,96	1,2
Solución de Resazurín	g/100 ml	g/7,5 ml	g/15 ml	g/20 ml	g/25 ml	g/30 ml	g/37,5 ml
Resazurín (C ₁₂ H ₆ NO ₄ Na)	0,1	0,0075	0,015	0,02	0,025	0,03	0,037
Agente reductor	g/100 ml	g/120 ml	g/240 ml	g/320 ml	g/400 ml	g/480 ml	g/600 ml
Cysteine HCl-HO ₂ CCH(NH ₂)CH ₂ SH	0,625	0,75	1,5	2	2,5	3	3,75
Hidróxido de sodio 1M (NaOH) 1M	4 ml	4,8	9,6	12,8	16	19,2	24
Sodium sulphide (Na ₂ SO ₄)	0,625	0,75	1,5	2	2,5	3	3,75
Medio de digestión							
Agua destilada	500 ml	504,3 ml	1008,6 ml	1344,8 ml	1681 ml	2017,2 ml	2521 ml
Caseína o trypticase peptona	0,2 g	1,02 g	2,04 g	2,72 g	3,4 g	4,08 g	5,1 g
Solución micro-mineral	0,1 ml	0,51 ml	1,02 ml	1,36 ml	1,7 ml	2,04 ml	2,5 ml
Solución buffer	200 ml	1020 ml	2040 ml	2720 ml	3400 ml	4080 ml	5100 ml
Solución macro-mineral	200ml	1020 ml	2040 ml	2720 ml	3400 ml	4080 ml	5100 ml
Solución de resazurín	1ml	5,1 ml	10,2 ml	13,6 ml	17 ml	20,4 ml	25 ml

METODOLOGÍA

1. Preparación del sustrato



Muestreo

Una vez se han identificado las especies que se desea evaluar con ayuda de la técnica, se procede a su muestreo, teniendo en cuenta las recomendaciones ya conocidas según sea el caso y el tipo de especie (herbácea, arbustiva, arbórea, tubérculo, heno, concentrado, ensilaje, amonificado, etc.), y la fracción (hojas, tallos, raíces, flores, frutos, etc.) que se desea muestrear.



Secado

El contenido y la naturaleza de varios constituyentes del alimento y por consiguiente, la cinética de fermentación, pueden ser influenciados por la temperatura y el proceso de secado del sustrato. La mayoría de los autores recomiendan hacer secado por congelación o en horno a baja temperatura (60 o 70°C) (Williams 2000; Rosero 2002).

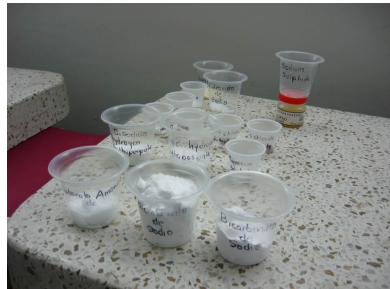
Molienda

Un menor tamaño de partícula aumenta el área de superficie para la degradación microbiana. Para el análisis de producción de gas, se recomienda moler los sustratos a través de una malla de 1 mm (Williams 2000).

Tamaño de la muestra

La cantidad de material requerido para evaluar la cinética de fermentación varía desde 0.1 a 1 g (Williams 2000). Con un aumento en el tamaño de la muestra se produce una disminución en la





producción de gas por cada gramo de MS, debido a la baja proporción de microorganismos en relación al sustrato o al agotamiento del tampón (Getachew et al 1998). La técnica emplea 1 gramo de sustrato.

Preparación de los frascos de incubación

La incubación se debe realizar en frascos de vidrio (viales N20) con capacidad de 110 ml. Antes del inicio del experimento, los frascos de incubación deben ser lavados con abundante agua y secados en una estufa a 105°C por 12 horas. Después del secado, los frascos deben ser rotulados y se pueden saturar con CO₂ y posteriormente agregar 1 gramo del sustrato en cada uno.



2. Preparación del medio

Todos los medios en uso tienen en común tampón de bicarbonato y fosfato, un agente reductor, una fuente de nitrógeno, varios minerales, y resazurín como indicador de potencial redox. En todos los casos, el CO₂ es usado durante la preparación del medio para asegurar un bajo potencial redox al momento de la inoculación, ya que la ausencia de anaerobiosis resulta en pérdidas de bacterias celulolíticas y amilolíticas (Williams 2000). Grant y Mertens (1992b) indican que el gaseo continuo con CO₂ y los agentes reductores promueven un menor tiempo de colonización y una más rápida digestión de la FDN.

Para el caso se describe el procedimiento de preparación del medio de digestión para 100 botellas, el que se debe preparar un día antes de la inoculación de las mismas y del inicio de la prueba.

Solución buffer@

En 3400 ml de agua destilada previamente calentada a 39°C se adicionan cuidadosamente 13,6 g de Amonium hydrogen Carbonate (NH₄HCO₃) y 119 g de hydrogen Carbonate (NaHCO₃) mezclando hasta conseguir una

completa disolución. Esta solución se reserva en refrigeración y se marca como solución 2.

Solución macro-mineral ③

De la misma manera en otro recipiente que contenga 3400 ml de agua destilada previamente calentada a 39°C se adiciona 15,2 g de di-Sodium hydrogen Orthopospate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), 21,08 g de di-Hydrogen Orthopospate (KH_2PO_4) y 2,04 g de Magnesium sulphate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), y la solución se reserva como solución 3.

Solución micro-mineral

En 10 ml de agua se adiciona 1,32 g de Calcium chloride 2-hydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 1 g de Manganese chloride 4-hydrate ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 0,1 g de chloride 6-hydrate ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y 0,8 g de chloride 6-hydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), se mezcla y se reserva.

Solución de Resazurín

En 25 ml de agua se disuelven 0,025 g de resazurín.

Agente reductor

En 400 ml de agua se mezclan la cisteyna (2,5 g), el NaOH 1M (16 ml) y el Sodium sulphide (2,5 g). En caso de no disponer de NaOH 1M, se prepara mediante la disolución de 4 gramos de NaOH en 100 ml de agua.



Medio de digestión

Inicialmente se prepara la **solución ①**, en 1681 ml de agua destilada a la que se le adiciona el triptycase peptona (3,4 g) y 1,7 ml de solución micro-mineral, homogenizando completamente. Se recomienda emplear peptona liofilizada, puesto que la que viene en roca resulta muy complicada de mezclar con el agua.

Una vez se tienen las soluciones ①, ② y ③, junto con la solución de Resazurín y el agente reductor se proceden a mezclar en un recipiente amplio todas las soluciones, en

el siguiente orden y cantidades.

- ✓ 1681 ml de solución ①
- ✓ 3400 ml de la solución ②
- ✓ 3400 ml de la solución ③ y
- ✓ 17 ml de solución de Resazurín



Una vez se ha homogenizado completamente se gasea por espacio de 5-10 minutos con CO₂.

Tras haber gaseado y con la ayuda de una bureta, se agregan 85 ml de la mezcla a cada una de las botellas a incubar, las que deben contener 1 gramo del sustrato a evaluar en la prueba, y se adicionan también 4 ml de solución reductora la que permitirá obtener una coloración rosada.

Cuando las botellas contienen el sustrato, el medio y la solución reductora, se sellan con los corchos plásticos y posteriormente con los sellos de aluminio con la ayuda del crimper manual, y se llevan a refrigeración hasta el día siguiente a una temperatura de 4-5 °C.



4. Inóculo



Obtención

El fluido ruminal tomado después del ayuno es menos activo que el que se colecta dos horas después de alimentar, pero es más consistente en su composición y actividad. Como regla general, se recomienda colectar el inóculo antes de la alimentación y de por lo menos tres



animales consumiendo la misma dieta. (Williams 2000). La incubación de un mismo sustrato puede conducir a diferente producción de gas si el fluido ruminal es tomado en diferentes días, situación que deberá corregirse por la introducción de estándares de conocida producción de gas (Getachew et al 1998).

Preparación

El licuado incrementa en el inóculo el número de bacterias previamente adheridas a la fibra, la mayoría celulolíticas, pero también el número de partículas pequeñas del alimento, por lo que la producción de gas en los frascos de incubación y en los blancos se hace mayor (Pell y Schofield 1993). El procedimiento de licuado puede también aumentar el riesgo de exposición al oxígeno si el flujo de CO₂ no es suficientemente fuerte (Williams 2000).

Proporción de inóculo a medio

Estudios *In vitro* describen que un medio conteniendo 20 a 25% de fluido ruminal da los mejores resultados (Schofield 2000). Sin embargo, la cantidad de inóculo adicionado varía ampliamente entre grupos (Williams 2000). Algunas proporciones líquido ruminal:tampón son 1:2 (Cone et al 1996; Menke y Steingass 1998); 1:4 (Pell y Schofield 1993), 1:9 (Theodorou et al 1994; Mauricio et al 1999).

El día de colección del inóculo se alista previamente un termo precalentado a 39°C con agua caliente, suficiente gasa plegada en cuatro dobleces para el filtrado, un embudo y un recipiente amplio.

En el caso de coleccionar inóculo de animales fistulados, la colección se debe hacer en las primeras horas de la mañana, teniendo en cuenta que los animales estén siendo alimentados con una misma dieta básica, la que no necesariamente debe estar compuesta de las pasturas o especies a evaluar.



En el caso de coleccionar in6culo de tipo fecal, esta coleccion se debe de hacer tambien en horas de la ma1ana y *per rectum* con la ayuda de mangas pl6sticas, descartando siempre las primeras porciones encontradas a lo largo de la porcion terminal del tracto digestivo.

Cuando se trata de una coleccion de in6culo ruminal de animales que van a ser sacrificados, se debe garantizar alimentacion con pasto antes del sacrificio y una r6pida evisceracion para evitar la muerte de la poblacion ruminal. na vez coleccionado el in6culo y depositado en los termos, este se debe transportar lo m6s pronto posible hasta el laboratorio, (30-45 minutos m6ximo) donde ser6 filtrado a trav6s de la gasa hacia un recipiente amplio y posteriormente aclimatado a 39°C y gaseado constantemente con CO₂ antes de la inoculacion.

Cuando el in6culo proviene de heces, para facilitar el proceso de filtrado, dada su consistencia, se recomienda preparar una cantidad adicional de soluci6n tamp6n para mezclarla con estas y as6 facilitar su homogenizacion.



La cantidad de soluci6n tamp6n a utilizar se puede manejar en una proporcion de 1 a 2, es decir 2 partes de in6culo fecal por 1 de soluci6n tamp6n.

Tras el gaseo continuo, el que asegura la sobrevivencia microbiana, con la ayuda de jeringas se adicionan 10 ml de in6culo a cada una de las botellas, las que previamente han sido sacadas de refrigeracion y calentadas a 39°C.

Una vez inoculadas, se debe ajustar la presi6n de las botellas a cero y estas deben ser llevadas a temperatura constante de 39°C en un ba1o mar6a, donde se llevar6 a cabo todo el procedimiento de fermentacion.

Finalmente cada una de las botellas deber6 contener:

- a. 1 gramo de muestra
- b. 85 ml de medio de digesti6n
- c. 4 ml de agente reductor
- d. 10 ml de in6culo



4. Blancos

Una serie de botellas blanco conteniendo medio e inóculo pero no sustrato, es rutinariamente incluida en cada corrida. El promedio de gas registrado por los blancos, que normalmente corresponde al 13-27% de la lectura final, es substraído desde el total de gas producido por los sustratos evaluados, obteniendo así el total de gas realmente derivado desde la fermentación del sustrato.(Pell y Schofield 1993; Schofield 2000).

5. Estándares

Al igual que los blancos, los estándares (tres botellas con heno, heno+almidón, concentrado o pasturas de producción de gas conocida) son corridas en cada experimento. Cada estándar tiene una producción de gas conocida, determinada por el promedio de muchas réplicas. Si el estándar incluido dentro de una corrida produce entre el 90 y el 110% del gas con respecto al valor promedio, entonces el fluido ruminal es calificado como normal y todas las medidas de volumen de gas son corregidas por el factor "promedio del volumen estándar/volumen estándar de la corrida". Si, por el contrario, el volumen estándar de la corrida está situado por fuera de este rango, el dato de la corrida es desechado (Schofield 2000).

6. Lecturas de presión y volumen de gas



La presión (psi=libras por pulgada cuadrada) originada por los gases acumulados en la parte superior de los frascos se mide a través de un transductor de presión tipo 158005 PSA-1 Autonics (análogo de la versión del Transductor de presión tipo T443A Bailey y Mackey, Inglaterra), con lector digital conectado a una fuente de energía de 15 voltios y a una válvula de tres salidas. La primera salida se debe conectar a una aguja (0.7 mm), la segunda es conectada al transductor de presión y la tercera a una jeringa plástica que sirve para la medición del volumen de gas.





Para la medición de la presión, la aguja acoplada a la válvula debe ser insertada a través de la tapa de caucho, y para la medición del volumen, los gases acumulados en la parte superior se retiran con el uso de la jeringa hasta el momento en que la presión registrada en el lector digital alcance a ser cero.

Las lecturas que permiten obtener una adecuada curva de degradación del material incubado, se realizan en los horarios 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 19, 24, 30, 36, 48, 60, 72 y 96

horas y los datos obtenidos deben ser transferidos a un computador para su análisis posterior.

Este proceso se repite en todos los frascos y después de las lecturas deben ser manualmente agitados y reubicados en el baño maría.

7. Muestras para cromatografía



Uno de los objetivos del empleo de la técnica, es lograr cuantificar la producción de gases con potencial de efecto invernadero, y para ello se requiere de la toma de muestras que posteriormente serán analizadas mediante cromatografía de gases.



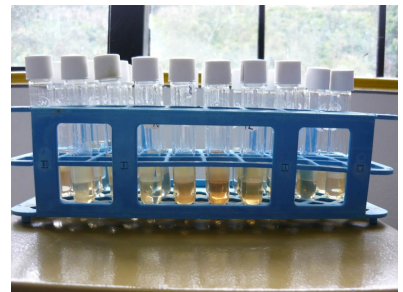
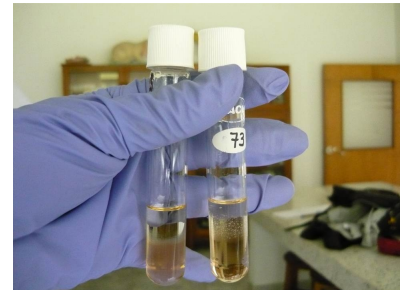
Para ello el procedimiento que se debe seguir es que se incubaba una botella adicional por muestra corrida de la que se extraen los gases acumulados y con ayuda de una jeringa se transfiere el gas a viales de vidrio de 10 ml previamente sellados y ajustados la presión a cero, los que se refrigeran a 4°C hasta tanto puedan ser analizados y posteriormente con ayuda



de una jeringa Headspace Soil Gas Syringe se extraen de los viales y se inyectan en el cromatógrafo para su posterior análisis.

Para el caso de análisis y cuantificación de AGV's, de cada botella adicional que se incuba por muestra corrida, se toma una alícuota de sobrenadante, la que se somete al siguiente procedimiento para su posterior análisis en el cromatógrafo.

- ✓ 2 ml de sobrenadante de cada muestra se depositan en tubos de ensayo de vidrio con tapa rosca, se les adiciona 2 ml de ácido fosfórico al 30% y se refrigera a 4°C.
- ✓ Tras una refrigeración de mínimo 24 horas, las muestras se centrifugan a 8000 g por 10 minutos a fin de separar sólidos de líquidos.
- ✓ La fase líquida de cada muestra se transfiere a nuevos tubos de ensayo y se congela durante 12 horas.
- ✓ A cada muestra se le adicionan 2 ml de éter etílico y se agita manualmente por espacio de 3 minutos liberando el gas producido de forma gradual.
- ✓ Tras la agitación se formaran tres fases fácilmente identificables en el interior de los tubos. Una fase superficial denominada fase etérea u orgánica en la que se hallan contenidos los AGV's y demás compuestos apolares solubles en éter, una fase intermedia a especie de gel, denominada fase de quelatos, la que contiene compuestos de mayor complejidad, y una fase inferior de consistencia mas líquida formada por otro tipo de compuestos.
- ✓ Nuevamente las muestras se refrigeran mínimo por 24 horas, al cabo de las



cuales se separa la fase etérea y de quelatos de los tubos, a cuyas porciones se le adiciona 1 ml de solución de NaCl al 10%, se agita y se refrigera por 3 horas con el fin de permitir mayor diferenciación de la fase etérea.

- ✓ Posteriormente las muestras se sonicán en un equipo de ultrasonido por 15 minutos aproximadamente y una vez más se separa la fase etérea del resto de los componentes encontrados en la muestra.
- ✓ El procedimiento siguiente es derivatizar mediante la adición de 5 ml de metanol ácido clorhídrico al 5%, dejar las muestras durante la noche en incubación a 50°C, posteriormente adicionar éter y agua destilada para separar las fases hasta obtener la fase etérea lo mas diferenciada posible de la que 2 ml se inyectan en el cromatógrafo para su respectivo análisis e identificación de acetato, propionato y butirato principalmente.

8. Filtrado de residuos



Una vez ha concluido el periodo de experimentación, las botellas se deben almacenar en refrigeración a 4°C hasta el filtrado.

Durante este proceso se debe cuidar minuciosamente el evitar la pérdida de residuo durante el lavado de las botellas, pues de ello depende una acertada determinación de la degradabilidad de la materia seca y demás componentes del alimento.



Después del filtrado a través de crisoles cada una de las muestras se seca en estufa a 105 °C para estimar la degradabilidad de la materia seca y luego el residuo se incinera en mufla a 600 °C para la determinación de la degradabilidad de la materia orgánica.

RESUMEN

1. Pesar un gramo de muestra en cada una de las botellas a incubar en la prueba.
2. Preparar la solución buffer, macro-mineral, micro-mineral, y de resazurín. Almacenarlas en nevera a 4 °C hasta el momento de requerirlas.
3. Un día antes del experimento preparar el medio de digestión y el agente reductor. Dispensarlos en las botellas con la muestra y llevarlas a refrigeración hasta el día siguiente.
4. El día de inicio del experimento calentar las botellas a 39°C antes de empezar.
5. Colectar y preparar el inóculo.
6. Inocular las botellas con licor ruminal o fecal, según sea el caso.
7. Incubar las botellas a 39°C hasta el final del periodo de fermentación (96 horas).
8. Después de cada lectura agitar las botellas, permitiendo que el material adherido a las paredes se mezcle con el resto de la solución.
9. Al final del experimento almacenar las botellas a 4°C hasta que se lleve a cabo el filtrado.
10. Filtrar y secar en estufa a 105 °C para determinación de degradabilidad de la materia seca
11. Quemar el residuo en mufla a 600 °C para determinar degradabilidad de la materia orgánica.

Anexo B. Especies forrajeras evaluadas

Tratamiento 0: Alimento base

Mezcla: *Lolium sp.*, *Holcus lannatus*, *Trifolium repens*, *Dactylis glomerata*, *Rumex sp.*, *Taraxacum officinale*, y *Raphanus sativus L.*



Tratamiento 1: Mezcla Raigrases (*Lolium* sp.)



Tratamiento 2: Alfalfa (*Medicago sativa*)



Tratamiento 3: Pasto brasileiro (*Phalaris arundinacea*)



Tratamiento 4: Te (*Otholobium munyense*)



Tratamiento 5: Chilca colorada (*Baccharis latifolia* H.B.K.)



Tratamiento 6: Abutilón (*Abutilon striatum* van)



Tratamiento 7: Acacia negra (*Acacia decurrens*)



Tratamiento 8: Rábano forrajero (*Raphanus sativus* L.).



Tratamiento 9: Sauco (*Sambucus nigra*)



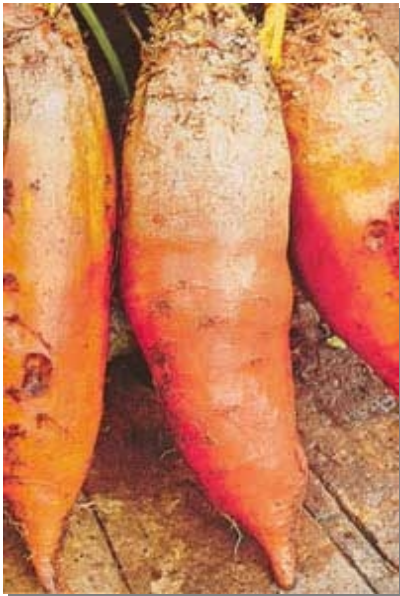
Tratamiento 10: (*Ambrosia arborescens*)



Tratamiento 11: Remolacha forrajera follaje (*Beta vulgaris*)



Tratamiento 12: Remolacha forrajera fruto (*Beta vulgaris*)



Anexo C. Análisis Estadístico

The Mixed Procedure
Model Information

Data Set	PRODUCCION DE GAS
Dependent Variable	gas
Covariance Structure	Compound Symmetry
Subject Effect	repeticion
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information

Class	Levels	Values
trat	10	T0 T1 T11 T12 T10 T2 T3 T4 T5 T6 T7 T8 T9
repeticion	4	F1 F2 R1 R2
hora	15	2 4 6 8 10 12 15 19 24 30 36 48 60 72 96

Dimensions

Covariance Parameters	2
Columns in X	176
Columns in Z	0
Subjects	4
Max Obs Per Subject	150

Number of Observations

Number of Observations Read	780
Number of Observations Used	780
Number of Observations Not Used	0

Iteration History

Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	2192.06936401	
		173	

1 1 2149.99389599 0.00000000

The Mixed Procedure

Model Information

Data Set	DEGRADABILIDAD MO
Dependent Variable	deg
Covariance Structure	Compound Symmetry
Subject Effect	inóculo(trat)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information

Class	Levels	Values
trat	13	Abutilón Acacia Alfalfa Altamisa Brasilero Chilca Alimento base Rabano Raigrass Remolacha Follaje Remolacha Fruto Sauco Te
inóculo	2	1Ruminal 2Fecal
hora	2	6 96

	Dimensions
Covariance Parameters	2
Columns in X	27
Columns in Z	0
Subjects	26
Max Obs Per Subject	4

Number of Observations

Number of Observations Read	104
Number of Observations Used	104
Number of Observations Not Used	0

Iteration History

Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	320.39799890	
1	1	320.01242919	0.00000000

Convergence criteria met.

The Mixed Procedure

Estimated R Matrix for inóculo(trat)

Row	col1	col2	col3	col4
1	28.4599	-2.2916	-2.2916	-2.2916
2	-2.2916	28.4599	-2.2916	-2.2916
3	-2.2916	-2.2916	28.4599	-2.2916
4	-2.2916	-2.2916	-2.2916	28.4599

Estimated R Correlation Matrix
for inóculo(trat)

Row	col1	col2	col3	col4
1	1.0000	-0.08052	-0.08052	-0.08052
2	-0.08052	1.0000	-0.08052	-0.08052
3	-0.08052	-0.08052	1.0000	-0.08052
4	-0.08052	-0.08052	-0.08052	1.0000

Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
CS	inóculo(trat)	-2.2916
Residual		30.7515

Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	320.0
-----------------------	-------

ABC (smaller is better)	324.0
ABCC (smaller is better)	324.3
BBC (smaller is better)	325.6

Null Model Likelihood Ratio Test

DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
1	0.39	0.5346

Solution for Fixed Effects

Effect	trat	hora	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
Intercept			44.1295	2.5577	13	17.25	<.0001
trat	Abutilón		21.0475	3.6172	13	5.82	0.0004

The Mixed Procedure

Solution for Fixed Effects

Effect	trat	hora	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
trat	Abutilon		11.3400	3.6172			
trat	Acacia		12.2900	3.6172	13	3.40	0.0094
trat	Alfalfa		10.2340	3.6172	13	7.40	0.0001
trat	Altamisa		28.3125	3.6172	13	7.83	<.0001
trat	Brasiler		2.9525	3.6172	13	0.82	0.4380
trat	Chilca		-2.2825	3.6172	13	-0.63	0.5456
trat	Alimento base		23.6825	3.6172	13	6.55	0.0002
trat	Rabano		30.4275	3.6172	13	8.41	<.0001
trat	Remol foll		23.6825	3.6172	13	6.55	0.0002
trat	Remol frut		30.4275	3.6172	13	8.41	<.0001
trat	Raigrass		23.6825	3.6172	13	6.55	0.0002
trat	Sauco		30.4275	3.6172	13	8.41	<.0001
trat	Te		0
hora		6	-43.2120	3.9212	13	-11.02	<.0001
hora		96	0

Covariance Structure	Compound Symmetry
Subject Effect	inóculo(trat)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information

Class	Levels	Values
trat	13	Abutilón Acacia Alfalfa Altamisa Brasileño Chilca Pasto base Rabano Raigrass Remolacha Follaje Remolacha Fruto Sauco Te
inóculo	2	1Ruminal 2Fecal
hora	2	6 96

Dimensions

Covariance Parameters	2
Columns in X	27
Columns in Z	0
Subjects	26
Max Obs Per Subject	4

Number of Observations

Number of Observations Read	104
Number of Observations Used	104
Number of Observations Not Used	0

Iteration History

Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	284.25384820	
1	1	283.56592733	0.00000000

Convergence criteria met.

The Mixed Procedure

Estimated R Matrix for inóculo (trat)

Row	col1	col2	col3	col4
1	14.3337	1.7122	1.7122	1.7122
2	1.7122	14.3337	1.7122	1.7122
3	1.7122	1.7122	14.3337	1.7122
4	1.7122	1.7122	1.7122	14.3337

Estimated R Correlation Matrix
for inóculo(trat)

Row	col1	col2	col3	col4
1	1.0000	0.1195	0.1195	0.1195
2	0.1195	1.0000	0.1195	0.1195
3	0.1195	0.1195	1.0000	0.1195
4	0.1195	0.1195	0.1195	1.0000

Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
CS	inóculo(trat)	1.7122
Residual		12.6215

Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	283.6
ABC (smaller is better)	287.6
ABCC (smaller is better)	287.8
BAC (smaller is better)	289.1
Null Model Likelihood Ratio Test	

DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
1	0.69	0.4069

Solution for Fixed Effects

Effect	trat	hora	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
Intercept			51.0035	2.0029	13	25.47	<.0001
trat	Abutilón		23.0550	2.8325	13	8.14	<.0001

The Mixed Procedure
Solution for Fixed Effects

Effect	trat	hora	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
trat	Abutilon		20.9950	2.8325	8	7.41	<.0001
trat	Acacia		28.7325	2.8325	8	10.14	<.0001
trat	Alfalfa		14.3925	2.8325	8	5.08	0.0010
trat	Altamisa		28.4500	2.8325	8	10.04	<.0001
trat	Brasilero		3.4950	2.8325	8	1.23	0.2523
trat	Chilca		4.8300	2.8325	8	1.71	0.1265
trat	Pasto base		20.9950	2.8325	8	7.41	<.0001
trat	Rabano		20.9950	2.8325	8	7.71	<.0001
trat	Remolacha Foll		28.7325	2.8325	8	10.24	<.0001
trat	Remolacha Fru		0	0	8	0	<.0001
trat	Raigrass		20.9950	2.8325	8	7.51	<.0001
trat	Sauco		28.7325	2.8325	8	10.34	<.0001
trat	Te		20.4560	0	8	0	<.0001
hora		6	-49.9410	2.5121	8	-19.88	<.0001
hora		96	0	.	.	.	<.0001
trat*hora	Abutilón	6	-22.5750	3.5527	8	-6.35	0.0002
trat*hora	Abutilón	96	0
trat*hora	Acacia	6	-28.1325	3.5527	8	-7.92	<.0001
trat*hora	Acacia	96	0
trat*hora	Alfalfa	6	-14.0925	3.5527	8	-3.97	0.0041
trat*hora	Alfalfa	96	0
trat*hora	Altamisa	6	-27.8575	3.5527	8	-7.84	<.0001
trat*hora	Altamisa	96	0
trat*hora	Brasiler	6	-3.4225	3.5527	8	-0.96	0.3636
trat*hora	Brasiler	96	0
trat*hora	Chilca	6	-4.7275	3.5527	8	-1.33	0.2200
trat*hora	Chilca	96	0
trat*hora	Pasto base	6	-22.5750	3.5527	8	-6.35	0.0002
trat*hora	Pasto base	96	0

trat*hora	Rabano	6	-14.0925	3.5527	8	-3.97	0.0041
trat*hora	Rabano	96	0
trat*hora	Remol foll	6	-27.8575	3.5527	8	-7.84	<.0001
trat*hora	Remol foll	96	0
trat*hora	Remol frut	6	-3.4225	3.5527	8	-0.96	0.3636
trat*hora	Remol frut	96	0
trat*hora	Raigrass	6	-20.5575	3.5527	8	-5.79	0.0004
trat*hora	Raigrass	96	0
trat*hora	Sauco	6	-28.1325	3.5527	8	-7.92	<.0001
trat*hora	Sauco	96	0
trat*hora	Te	6	0
trat*hora	Te	96	0

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
trat	12	13	14.21	0.0006
hora	1	13	5374.36	<.0001
trat*hora	12	13	20.17	0.0002

The SAS System

The REG Procedure
Model: INÓCULO RUMINAL Y FECAL
Dependent Variable: volumen

Number of Observations Read 900
Number of Observations Used 900

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	18582	18582	25660.8	<.0001
Error	898	650.27155	0.72413		
Corrected Total	899	19232			

Root MSE	0.85096	R-Square	0.9662
Dependent Mean	7.10326	Adj R-Sq	0.9662
Coeff Var	11.97986		

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	-0.06962	0.05301	-1.31	0.1894
pres	1	5.61658	0.03506	160.19	<.0001

The SAS System

The REG Procedure
 Model: INÓCULO RUMINAL
 Dependent Variable: volumen

Number of Observations Read	450
Number of Observations Used	450

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	6105.41850	6105.41850	9813.24	<.0001
Error	448	278.72832	0.62216		
Corrected Total	449	6384.14682			

Root MSE	0.78877	R-Square	0.9563
Dependent Mean	7.58042	Adj R-Sq	0.9562
Coeff Var	10.40538		

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	-0.23707	0.08724	-2.72	0.0068
pres	1	5.78207	0.05837	99.06	<.0001

The SAS System
 The REG Procedure
 Model: INÓCULO FECAL
 Dependent Variable: volumen

Number of Observations Read 450
 Number of Observations Used 450

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	12282	12282	15250.4	<.0001
Error	448	360.80560	0.80537		
Corrected Total	449	12643			
	Root MSE	0.89742	R-Square	0.9715	
	Dependent Mean	6.62609	Adj R-Sq	0.9714	
	Coeff Var	13.54379			

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	-0.02402	0.06848	-0.35	0.7259
pres	1	5.53182	0.04479	123.49	<.0001